

# **Analytik und biologische Eigenschaften von neuen Titan(IV)- und Platin(II)-Komplexen als potentielle Antitumorwirkstoffe**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Julia Viktoria Schur  
aus Salzgitter

1. Referent:

Professor Dr. Ingo Ott

2. Referent:

Professor Dr. Hermann Wätzig

eingereicht am:

09.04.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am:

02.06.2014

Druckjahr 2014

---

## Veröffentlichungen der Dissertation

*Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:*

### Publikationen

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tacke and I. Ott. Quantification of the titanium content in metallodrugs exposed tumor cells using HR-CS AAS. *Metallodrugs* 1 (2014) 1-9.

**J. Schur**, C.M. Manna, A. Deally, R.W. Köster, M. Tacke, E.Y. Tshuva and I. Ott. A Comparative Chemical-Biological Evaluation of Titanium(IV) Complexes with a Salan or Cyclopentadienyl Ligand. *Chemical Communications* 49 (2013) 4785 - 4787.

A. Lüning, **J. Schur**, L. Hamel, I. Ott, and A. Klein. Tremendous Cytotoxicity of Organometallic Platinum Complexes with Alkynyl Ligands. *Organometallics* 32 (2013) 3662-3672.

### Tagungsbeiträge

**J. Schur**. Toxicity and Biodistribution of Novel Titanium(IV) Anticancer Agents. RICT 2013 (2013), Nizza.

**J. Schur**. Comparative Biological Evaluation of Novel Titanium(IV) Complexes. Informal Meeting PPP Hongkong (2013), Braunschweig.

**J. Schur**. Toxizität und Bioverteilung neuer Titan-Antitumorwirkstoffe. Pharmazieseminar (2013), Technische Universität Braunschweig.

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, A. Deally, M. Tacke, R.W. Köster and I. Ott. Toxicity and Biodistribution of Novel Ti(IV) Complexes. Chemistry of Metals in Biological Systems Summer School (2013), Louvain-la-Neuve.

**J. Schur**. Biological Investigation of Novel Ti(IV) Complexes. Young Investigator Symposium on Medicinal Organometallic Chemistry (2013), Fulpmes/Innsbruck.

---

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, A. Deally, M. Tacke, R.W. Köster and I. Ott. Biological Evaluation of Novel Ti(IV) Complexes. 11<sup>th</sup> Ferrocene Colloquium (2013), Hannover.

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, A. Deally, M. Tacke, R.W. Köster and I. Ott. New Titanium(IV) Complexes as Potential Anticancer Drugs. Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (2012), Greifswald.

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, A. Deally, M. Tacke, R.W. Köster and I. Ott. Biological Investigation of Cytotoxic Ti(IV) Complexes. 6<sup>th</sup> International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (2012), Toronto.

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, M. Tacke and I. Ott. Cellular Uptake Studies of Cytotoxic Ti(IV) Complexes using HR-CS AAS. 10<sup>th</sup> Ferrocene Colloquium (2012), Braunschweig.

**J. Schur**, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, M. Tacke and I. Ott. Studies on Cytotoxicity, Cellular Uptake and Protein Binding Ability of Ti(IV) Complexes using HR-CS AAS. 15<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry (2011), Vancouver.



---

## Danksagung

Allen voran danke ich meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Ingo Ott für die Betreuung meiner Promotion, die ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Konferenzteilnahmen. Vor allem möchte ich mich für die gewährten Freiheiten bei der Erarbeitung des Themas und der Hilfsbereitschaft auch über wissenschaftliche Themen hinaus bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) möchte ich meinen herzlichen Dank für die Übernahme des Koreferats aussprechen. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Ute Wittstock (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig) für die Übernahme der Leitung der Prüfungskommission.

Bei Frau Prof. Dr. Edit Tshuva (Institut für Anorganische Chemie, Hebrew University of Jerusalem) und ihren Mitarbeitern, Herrn Dr. Matthias Tacke (UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin) und seinen Mitarbeitern, Herrn Prof. Dr. Axel Klein (Universität Köln, Institut für Anorganische Chemie) und seinen Mitarbeitern sowie Herrn Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte (Institut für Anorganische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) und seiner Mitarbeiterin Anna Sosniak bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Köster (Zoologisches Institut, TU Braunschweig) und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank der Möglichkeit *in vivo*-Experimente durchzuführen.

Dr. Lutz Preu und seinem Team danke ich für die nette Atmosphäre bei der Praktikumsbetreuung.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die tolle, gemeinsame Zeit im Labor bedanken.

Mein tiefster Dank gilt Waldemar, der mich immer ermutigt und unterstützt.

---

---

*für meine Mutter*

---

---

If we knew what it was we were doing,  
it would not be called research...

- Albert Einstein 1879-1955 -

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Veröffentlichungen der Dissertation .....</b>	<b>iii</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>xv</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>xxiv</b>
<b>I     <b>Einleitung</b> .....</b>	<b>1</b>
1.    Metallkomplexe in der Tumorthherapie .....	2
1.1   Krebsentstehung und -inzidenz .....	4
1.2   Von Antiinfektiva zu Antitumorwirkstoffen: Geschichte der medizinischen Verwendung von Metallen .....	5
1.3   Beispiele neuer Strategien für metallbasierte Antitumorwirkstoffe..	7
1.3.1   Antitumoraktive Titan(IV)-Komplexe .....	7
1.3.2   Organometallische Platin(II)-Komplexe als Antitumorwirkstoffe	10
2.    Zielsetzung .....	12
<b>II    <b>Grundlagen</b> .....</b>	<b>15</b>
3.    Weg des Arzneistoffs im Organismus.....	16
3.1   Transportprozesse durch Biomembranen .....	17
3.2   Bioverteilung und molekulare Erkennung von Arzneistoffen .....	20
4.    Targets von metallbasierten Antitumorwirkstoffen .....	22
4.1   DNA.....	23
4.1.1   Struktur der DNA .....	23
4.1.2   Wechselwirkungen von Metallkomplexen mit der DNA .....	24
4.2   Enzyme .....	27
4.2.1   Enzymkinetik .....	29
4.2.2   Hemmung der Enzymaktivität.....	32
4.3   Zellulärer Redoxstoffwechsel .....	36
4.3.1   Glutathion- und Thioredoxin-System .....	37
4.3.2   Antitumoraktive Thioredoxininhibitoren.....	40
4.3.3   Eingriffsmöglichkeiten von Metallkomplexen in das Antioxidative Netzwerk der Zelle.....	42

5.	Der Zebrafisch als Modellorganismus für die präklinische Arzneistoffentwicklung .....	44
5.1	Entwicklungsbiologie des Zebrafischs .....	44
5.2	Toxikologisches Screening von Arzneistoffen .....	46
6.	Atomabsorptionsspektrometrie zur Analytik von Metallen im biologischen Material.....	49
6.1	Messprinzip der Atomabsorptionsspektrometrie.....	50
6.2	Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers .....	51
6.3	Vorteile der HR-CS AAS gegenüber der AAS .....	53
<b>III</b>	<b>Biochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus von neuartigen Titan(IV)-Komplexen .....</b>	<b>55</b>
7.	Synthese von neuartigen Titan(IV)-Komplexen .....	56
7.1	Synthese und Stabilität von Titan-Salan-Komplexen.....	56
7.2	Synthese, Strukturaufklärung und Stabilität von Titanocen Y .....	59
7.3	Zusammenfassung .....	60
8.	Entwicklung einer HR-CS AAS-Methode zur Titanquantifizierung.....	61
8.1	Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms.....	62
8.2	Untersuchung von Matrix- und Modifikatoreffekten .....	65
8.3	Validierung des Analysenverfahrens .....	68
8.4	Zusammenfassung .....	71
9.	Toxikologische Untersuchungen.....	72
9.1	<i>In vitro</i> -Toxizität .....	73
9.1.1	Zytotoxizität der Titan-Salan-Komplexe .....	75
9.1.2	Zytotoxizität von Titanocenderivaten .....	77
9.1.3	Videomikroskopie .....	77
9.1.4	Zusammenfassung .....	79
9.2	<i>In vivo</i> -Toxizität im Zebrafischembryo .....	80
9.3	Zusammenfassung .....	84
10.	Bindungsaffinität zu Biomolekülen.....	86
10.1	DNA-Bindung .....	87
10.2	Bindung an Serumalbumin .....	91
10.3	Zusammenfassung .....	95
11.	Untersuchungen zur Bioverteilung.....	96
11.1	Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation in Tumorzellen ....	97
11.2	Zeitabhängigkeit der Akkumulation in Tumorzellen .....	98
11.2.1	Einfluss von Serumproteinen auf die Akkumulation in Tumorzellen.....	100
11.2.2	Einfluss des Liganden auf die Zellaufnahme von Titan-Salan- Komplexen.....	102
11.2.3	Zusammenfassung .....	104
11.3	Intrazelluläre Verteilung der Titankomplexe .....	105



---

11.3.1	Akkumulation von Titankomplexen in Zellkernen.....	106
11.3.2	Akkumulation in Mitochondrien.....	108
11.3.3	Zusammenfassung .....	109
11.4	Zusammenfassung.....	109
12.	Zusammenfassende Diskussion.....	111
<b>IV</b>	<b>Synthese und biologische Eigenschaften von Platin(II)-Alkynyl-Komplexen .....</b>	<b>115</b>
13.	Synthese, Strukturaufklärung und Stabilität von Platin(II)-Alkynyl-Komplexen .....	116
13.1	Wirkstoffdesign.....	116
13.2	Darstellung der Platin-Alkynyl-Komplexe.....	118
13.2.1	Synthese der Liganden.....	118
13.2.2	Synthese der Platinkomplexe .....	118
13.2.3	Strukturaufklärung .....	120
13.3	Stabilitätsuntersuchungen .....	123
13.4	Zusammenfassung.....	123
14.	Toxikologische Untersuchungen.....	124
14.1	Zytotoxizität im Zellkulturmodell .....	125
14.2	Toxizität im Zebrafischmodell .....	128
14.3	Zusammenfassung.....	133
15.	Zellaufnahmeuntersuchungen .....	134
15.1	Platinquantifizierung .....	136
15.2	Akkumulation von Platin-Alkynyl-Komplexen in Tumorzellen .....	138
15.3	Zusammenfassung.....	142
16.	Untersuchungen zur DNA-Interaktion.....	143
16.1	DNA-Bindungsaffinität .....	143
16.2	Veränderung der DNA-Schmelztemperatur.....	145
16.3	Zusammenfassung.....	148
17.	<i>In situ</i> -Inhibition von Disulfidreduktasen .....	149
18.	Zusammenfassende Diskussion.....	154
<b>V</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>157</b>
19.	Material.....	158
19.1	Geräte .....	158
19.2	Lösungen und Reagenzien.....	159
20.	Methoden .....	162
20.1	Synthesen .....	162
20.1.1	Synthese der Titankomplexe .....	163
20.1.2	Synthese der Platinkomplexe .....	164
20.2	HR-CS AAS.....	171
20.2.1	Methodenentwicklung.....	171

---

20.2.2	Titanquantifizierung .....	172
20.2.3	Platinquantifizierung .....	173
20.3	Zytotoxizitätsuntersuchungen ( <i>In vitro</i> -Toxizität) .....	174
20.4	<i>In vivo</i> -Toxizität im Zebrafischembryo .....	178
20.5	Videomikroskopie .....	180
20.6	DNA-Bindung .....	180
20.6.1	Ethanolpräzipitationsmethode .....	180
20.6.2	DNA-Schmelztemperaturmethode .....	182
20.7	Proteinbindung .....	183
20.8	Proteinquantifizierung .....	185
20.9	Untersuchungen zur Bioverteilung .....	186
20.9.1	Zellaufnahmeuntersuchungen .....	188
20.9.2	Isolierung von Zellkernen .....	189
20.9.3	Isolierung von Mitochondrien .....	190
20.10	Enzymhemmung .....	192
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>195</b>
<b>VII</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>220</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Angriffspunkte von Zytostatika und Auswahl an Wirkstoffen .....	2
Abb. 1-2: Metallkomplexe in der Tumorthherapie oder klinischen Prüfung .....	3
Abb. 1-3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2006 [ <i>Wikipedia Commons</i> , file: „Krebsneuerkrankungen_2006_01.svg“] .....	4
Abb. 1-4: Zeitleiste zur medizinischen Verwendung von Metallen .....	6
Abb. 1-5: Titankomplexe in der klinischen Prüfung und Forschung .....	8
Abb. 1-6 Platinkomplexe mit 1,5-Cyclooctadien(cod)-Liganden .....	11
Abb. 2-1: Wirkstoffdesign der Platin(II)-Alkynyl-Komplexe (links: Dialkynyl-Komplexe, rechts: Alkyl/Alkynyl-Komplexe) .....	13
Abb. 3-1: Aufbau einer Biomembran mit eingelagerten Proteinen (Transportern, Kanäle etc.) .....	17
Abb. 3-2: Passiver Transport durch Biomembranen .....	18
Abb. 3-3: Aktiver Transport durch Biomembranen .....	19
Abb. 3-4: Bioverteilung von Arzneistoffen im menschlichen Organismus .....	20
Abb. 4-1: Basenpaarung in der DNA .....	23
Abb. 4-2: Strukturmodelle der A-DNA (links) und B-DNA (rechts) (nach: <i>Zephyris, Wikimedia Commons</i> , lizenziert unter <i>CreativeCommons-Lizenz by sa-2.0-de</i> , URL: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode">http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode</a> ) .....	24
Abb. 4-3: Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin mit Guanin in doppelsträngiger DNA [6] .....	25
Abb. 4-4: Schema der Interkalation von $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{AcmetOH})(\text{dppz})](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ mit der $\text{G}_1\text{T}_2/\text{C}_6\text{A}_5$ Sequenz des Hexanukleotids $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$ [74] .....	26
Abb. 4-5: Strukturformeln der relevanten Aminosäuren Cystein und Selenocystein. 28	
Abb. 4-6: Verlaufskurve einer enzymatisch katalysierten Reaktion, bei der die Umsatzgeschwindigkeit $v$ gegen die Substratkonzentration $S$ aufgetragen ist. 29	
Abb. 4-7: Bedeutung der katalytischen Konstante $k_{\text{kat}}$ und des Quotienten $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ nach Biele <i>et al.</i> [57] .....	31
Abb. 4-8: Verschiedene Formen der reversiblen Enzymhemmung .....	33
Abb. 4-9: Michaelis-Menten-Kinetik einer kompetitiven Hemmung (a) und nicht kompetitiven Hemmung (b) mit (1) und ohne (2) Inhibitor [ <i>Wikipedia Commons</i> ,	

files: „Michaelis-Menten_plot_competitive_inhibition.svg“ und „Michaelis-Menten_plot_non-competitive_inhibition.svg“ ].....	34
Abb. 4-10: Michaelis-Menten-Kinetik einer unkompetitiven Hemmung mit (1) und ohne (2) Inhibitor [Wikipedia Commons, file: „Michaelis-Menten_plot_uncompetitive_inhibition.svg“].....	34
Abb. 4-11: Lineweaver-Burk-Diagramm, doppelt-reziproke Darstellung, bei der $1/v$ über $1/[S]$ aufgetragen wird [Pro bug catcher, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0-de, URL: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode">http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode</a> ] .....	36
Abb. 4-12: Das Glutathion- und Thioredoxin-System nach Holmgren [94] (Erläuterungen zu den Abkürzungen siehe Text) .....	37
Abb. 4-13: Ribbon-Darstellung der TrxR [97] (links), Katalytisches Zentrum der TrxR [98] (rechts) .....	38
Abb. 4-14: Homologiemodell der GR und TrxR nach Zhong <i>et al.</i> [97].....	39
Abb. 4-15: Eingriffsmöglichkeiten von Metallwirkstoffen in den zellulären Redoxstoffwechsel .....	43
Abb. 5-1: Ausgewachsener, genetisch unveränderter Zebrafisch [Wikipedia Commons, file: „zebrafisch.jpg“] .....	44
Abb. 5-2: Zebrafischlaboratorien des Zoologischen Instituts der TU Braunschweig.	45
Abb. 5-3: Entwicklungsstadien des Zebrafischembryos a) nach 4 Stunden b) nach 25 Stunden c) nach 50 Stunden [132] .....	45
Abb. 5-4: Übersicht über die Durchführung des Screening auf Toxizität im Zebrafischembryo.....	47
Abb. 6-1: contrAA® 700 von Analytik Jena am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig .....	49
Abb. 6-2: Schematischer Aufbau einer HR-CS AAS nach Resano <i>et al.</i> und Welz <i>et al.</i> [156, 157].....	51
Abb. 6-3: 3D-HR-CS AAS-Signal von Titan (1,5 ppm) bei 364,27 nm .....	53
Abb. 7-1: Titan-Salan-Komplexe $Ti(L^{1-7})(OiPr)_2$ .....	56
Abb. 7-2: Syntheschema der Titan-Salan-Komplexe $Ti(L^{1-5})(OiPr)_2$ .....	57
Abb. 7-3: Reaktionsmechanismus der Mannich-Reaktion .....	58
Abb. 7-4: Stereoselektive Synthese der Titan-Salan-Komplexe $Ti(L^{6-7})(OiPr)_2$ .....	58
Abb. 7-5: Strukturen relevanter Titanocene .....	60
Abb. 7-6: Syntheschema von Titanocen Y .....	60

Abb. 8-1: Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms im Graphitofen mit wässrigen Titan-Standardlösungen ( $c = 1500 \mu\text{g/L}$ ). Oben: Pyrolysetemperatur, unten: Atomisierungstemperatur. (MW $\pm$ Stabw., $n = 2$ ) .....	63
Abb. 8-2: 3D-HR-CS AAS-Signale von Titan bei 364,2675 nm nach der Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms .....	64
Abb. 8-3: 3D-HR-CS AAS-Signale von Titan bei 364,2675 nm vor der Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms .....	65
Abb. 8-4: Einfluss der Matrixproteinkonzentration auf die Signalintensität von Titan-Standardlösungen. (MW, $n = 3$ ) .....	66
Abb. 8-5: Einfluss von verschiedenen Modifikatoren (Ascorbinsäure 10 g/L; Salzsäure 18 % (v/v), Salpetersäure 13 % (v/v)) auf die gemessene Absorption einer Titan-Standardlösung ( $1500 \mu\text{g/L}$ ) in Wasser und in zwei verschiedenen Matrix-Konzentrationen ( $c_1: 0,55 \text{ mg/mL}$ , $c_2: 1,10 \text{ mg/mL}$ ). ( $n = 1$ ) .....	67
Abb. 9-1: Veranschaulichung zum Vergleich der antiproliferativen Eigenschaften (zytostatisch/zytotoxisch) .....	72
Abb. 9-2: Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des $\text{IC}_{50}$ -Wertes .....	74
Abb. 9-3: HT-29 Zellen vor Substanzzugabe (links) und nach 10-stündiger Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Titankomplex (rechts). (oben: $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , unten: Titanocen Y) .....	78
Abb. 9-4: Dosis-Wirkungskurve der Titankomplexe in HT-29 Zellen. (MW $\pm$ Stabw., $n = 2-4$ ) .....	80
Abb. 9-5: <i>In vivo</i> -Toxizität von $0,2-100 \mu\text{M}$ Titan-Salan-Komplex $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{OiPr})_2$ in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, $n = 2$ ) .....	81
Abb. 9-6: <i>In vivo</i> -Toxizität von $0,2-100 \mu\text{M}$ Titanocen Y in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, $n = 2$ ) .....	82
Abb. 9-7: <i>In vivo</i> -Toxizität von $0,2-100 \mu\text{M}$ Titanocendichlorid in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, $n = 2$ ) .....	83
Abb. 9-8: Dosis-Wirkungskurve von Titanocendichlorid in 96 hpf Zebrafischembryos. (MW, $n = 2$ ) .....	84
Abb. 10-1: Mechanismus des Albumin (A)- und Transferrin (Tf)-basierten Transports von Titanocendichlorid ( $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ ) .....	87
Abb. 10-2: Strukturelle Ähnlichkeit der Titanocenderivate zu Cisplatin: (a) Cisplatin, (b) Titanocendichlorid, (c) Titanocen Y .....	88
Abb. 10-3: UV-Spektren verschiedener DNA-Konzentrationen von 175-350 nm .....	89

Abb. 10-4: Affinität der Titankomplexe zur DNA nach 4-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C (Ti-Y: Titanocen Y, $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ : Titanocendichlorid). (MW $\pm$ Stabw., n = 4)	89
Abb. 10-5: Struktur des humanen Serumalbumins mit drei unterschiedlichen Domänen und den Ligandenbindungsstellen. Die Sekundärstruktur ist in verschiedenen Farben dargestellt. [210] .....	91
Abb. 10-6: Albumin-Domäne mit der Cys-34-His-39-Konfiguration als mögliche Bindestelle für Metallwirkstoffe (rot eingekreist) [212] .....	93
Abb. 10-7: Proteinbindung der Titankomplexe $(\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ : Titan-Salan, Ti-Y: Titanocen Y, $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ : Titanocendichlorid). (MW $\pm$ Stabw., n = 4) .....	94
Abb. 11-1: : Konzentrationsabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach 2-, 6- und 27-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Titan-Salan-Komplexes $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ . (MW, n = 1-3) .....	97
Abb. 11-2: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10 $\mu\text{M}$ Titankomplex $(\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ : Titan-Salan, Ti-Y: Titanocen Y, $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ : Titanocendichlorid). (MW, n = 2-3) .....	99
Abb. 11-3: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10 $\mu\text{M}$ Titanocen Y in Zellkulturmedium mit Serum (grau) und ohne Serum (farblos). (MW $\pm$ Stabw., n = 3) .....	100
Abb. 11-4: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10 $\mu\text{M}$ $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ in Zellkulturmedium mit Serum (grau) und ohne Serum (farblos). (MW $\pm$ Stabw., n = 3) .....	101
Abb. 11-5: Zeitabhängige Akkumulation von Titan-Salan-Komplexen in HT-29 Zellen. (MW $\pm$ Stabw., n = 2-3) .....	103
Abb. 11-6: Korrelation der Zellaufnahme mit der Zytotoxizität der Titan-Salan-Komplexe .....	104
Abb. 11-7: Aufbau der Mitochondrien .....	105
Abb. 11-8: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in Zellkernen von HT-29 Zellen nach Inkubation mit 25 $\mu\text{M}$ Titan-Salan $(\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ ) bzw. Titanocen Y (Ti-Y). (MW $\pm$ Stabw., n = 4) .....	107
Abb. 11-9: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in Mitochondrien von HT-29 Zellen nach Inkubation mit 25 $\mu\text{M}$ Titan-Salan $(\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ ) bzw. Titanocen Y (Ti-Y). (MW $\pm$ Stabw., n = 3-4) .....	108
Abb. 13-1: Ligandensatz .....	116
Abb. 13-2: Organometallische cod-Platin(II)-Komplexe .....	117

Abb. 13-3: Syntheschema der Serie I .....	119
Abb. 13-4: Syntheschema der Serie II .....	119
Abb. 13-5: $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in $\text{CDCl}_3$ von 4-Methoxyphenylacetylen (oben) und $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$ (Mitte), in $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ von $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$ (unten) .....	122
Abb. 14-1: Mikroskopische Aufnahmen von Zebrafischembryos (links: Kontrolle, rechts: toxische Effekte sichtbar nach Inkubation mit $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$ ) .....	128
Abb. 14-2: Dosis-Wirkungskurve von Platin-Alkynyl-Komplexen. (MW, $n=2$ ) .....	130
Abb. 14-3: Entwicklung der Blutgefäße im Zebrafischembryo [228] (links: 24 hpf sind die Aorta (DA) und Bauchvenen (AV) ausgebildet, die Blutzirkulation erfolgt im Dottersack über die Kardinalvenen (DC)., rechts: 72 hpf hat sich das Blutgefäßsystem vollständig ausgebildet inklusive der subintestinalen Gefäße (SIVs)). (H = Herz).....	132
Abb. 14-4: <i>In vivo</i> -Toxizität von 0,2-50 $\mu\text{M}$ (a) $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$ , (b) $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})]$ , (c) $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$ und (d) $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$ in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, $n = 1-2$ ) .....	133
Abb. 15-1: Schema der relevanten Cisplatin-Resistenzmechanismen (GSH = Glutathion).....	134
Abb. 15-2: Einfluss der Matrixproteinkonzentration ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) auf die Signalintensität von Platin-Standardlösungen. (MW, $n = 1$ ).....	136
Abb. 15-3: 3D-HR CS-AAS Signal eines Platinstandards ( $c = 250 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) in biologischem Material (Proteinkonzentration = $1 \text{ mg/mL}$ ).....	137
Abb. 15-4: Zeitabhängige Akkumulation von Platin-Alkynyl-Komplexen der Serie I in HT-29 Zellen nach Inkubation mit $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ Platinkomplex. (MW $\pm$ Stabw., $n = 2-3$ ) .....	139
Abb. 15-5: Korrelation der Zytotoxizität und Zellaufnahme der Platinkomplexe der Serie I .....	140
Abb. 15-6: Zeitabhängige Akkumulation der Platin-Alkynyl-Komplexe $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})_2]$ und $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$ (oben) bzw. $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$ und $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$ (unten) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ Platinkomplex. (MW $\pm$ Stabw., $n = 2-3$ ).....	141

Abb. 16-1: Affinität ausgewählter Platinkomplexe zur DNA nach 4-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C. (MW ± Stabw., n = 3) .....	144
Abb. 16-2: Schmelztemperaturbestimmung von DNA [73] .....	145
Abb. 16-3: 1. Ableitung der Funktion der Schmelzkurve von ctDNA. (MW, n = 2) ...	146
Abb. 17-1: Struktur von Glutathion .....	149
Abb. 17-2: GR/TrxR katalysierte Umsetzung von DTNB (GR: Glutathionreduktase, TrxR: Thioredoxinreduktase, DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), TNB: 5-Thionitrobenzoesäure).....	149
Abb. 17-3: Möglicher Mechanismus der <i>in situ</i> -Inhibition von GR bzw. TrxR (GR: Glutathionreduktase, TrxR: Thioredoxinreduktase, DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), TNB: 5-Thionitrobenzoesäure).....	150
Abb. 17-4: Korrelation der Zytotoxizität (IC <sub>50</sub> -Wert in HT-29) mit der Enzymhemmung (IC <sub>50</sub> -Wert in TrxR) der Platinkomplexe .....	152
Abb. 20-1: Titan(IV)-Salan-Komplexe Ti(L <sup>1-7</sup> )(O <sup>i</sup> Pr) <sub>2</sub> .....	163
Abb. 20-2: Chemische Struktur der Serie I .....	165
Abb. 20-3: Chemische Struktur der Serie II .....	168
Abb. 20-4: Fließdiagramm zur Zytotoxizitätsuntersuchung.....	175
Abb. 20-5: Schema zur Bestimmung der <i>in vivo</i> -Toxizität .....	178
Abb. 20-6: Schematische Darstellung der Durchführung des DNA-Präzipitationsexperiments .....	181
Abb. 20-7: Schematische Darstellung der Durchführung des BSA-Ethanolpräzipitationsexperiments (BSA: Rinderserumalbumin) .....	184
Abb. 20-8: Schema zur Durchführung der Bradford-Methode .....	185
Abb. 20-9: Kalibriergerade mit BSA-Stammlösungen (BSA: Rinderserumalbumin)	186
Abb. 20-10: Mikroskopaufnahmen (40-fache Vergrößerung) von HT-29 Zellen (oben), MCF-7 Zellen (Mitte) und L-929 Zellen (unten) .....	187
Abb. 20-11: Schema zur Durchführung des <i>in situ</i> -Enzyminhibitionsexperiments...	193



## Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1: Einteilung der Enzyme nach Koolman <i>et al.</i> [77].....	27
Tab. 4-2: TrxR-Inhibitoren.....	40
Tab. 6-1: Standard-Temperatur-/Zeitprogramm für die GF-AAS.....	52
Tab. 6-2: Übersicht der Vorteile der HR-CS AAS .....	54
Tab. 7-1: Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) ausgewählter Titan-Salan-Komplexe in H <sub>2</sub> O/THF (1:9) bei RT. (MW $\pm$ Stabw.) .....	59
Tab. 8-1: Analytische Parameter der optimierten HR-CS AAS-Methode zur Titanbestimmung.....	70
Tab. 9-1: IC <sub>50</sub> -Werte der Titan-Salan-Komplexe in Tumorzellen. (MW $\pm$ Stabw., n = 3- 5) .....	75
Tab. 9-2: IC <sub>50</sub> -Werte der Titan-Salan-Komplexe in Mausfibroblasten. (MW $\pm$ Stabw., n = 3) .....	76
Tab. 9-3: IC <sub>50</sub> -Werte der Titanocenderivate. (MW $\pm$ Stabw., n = 3-5).....	77
Tab. 10-1: DNA-Bindung von Metallkomplexen. (MW $\pm$ Stabw., n = 4) .....	90
Tab. 13-1: Liste der von Klein <i>et al.</i> synthetisierten Platin-Alkynyl-Komplexe. (blau: Serie I, grün: Serie II) .....	118
Tab. 14-1: IC <sub>50</sub> -Werte der Platin-Alkynyl-Komplexe (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz) in drei verschiedenen Zelllinien. (MW $\pm$ Stabw., n = 1-5).....	126
Tab. 14-2: Lebende Embryos nach 2-tägiger Inkubation mit 10 $\mu$ M Platinkomplex (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz). (MW $\pm$ Stabw., n = 2-3) .....	129
Tab. 14-3: LC <sub>50</sub> -Werte im Zebrafischembryo und IC <sub>50</sub> -Werte in HT-29 Zellen ausgewählter Platin-Alkynyl-Komplexe (blau: Serie I, grün: Serie II). (MW, n = 2- 5) .....	131
Tab. 16-1: DNA-Bindungsaffinität von Platinkomplexen. (MW $\pm$ Stabw., n = 3).....	143
Tab. 16-2: Schmelztemperaturverschiebungen ( $\Delta T_m$ ) der ctDNA nach Inkubation mit Platinkomplexlösungen. (MW, n = 2-3).....	147
Tab. 17-1: <i>In situ</i> -TrxR- und GR-Inhibition von Platin-Alkynyl-Komplexen ausgedrückt in IC <sub>50</sub> -Werten (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz). (MW $\pm$ Stabw., n = 1-3).....	151
Tab. 20-1: Kommerziell erworbene Reagenzien.....	162

Tab. 20-2: Liste der im Arbeitskreis Klein synthetisierten Platinkomplexe des Typs [Pt(cod)(CCR) <sub>2</sub> ] .....	166
Tab. 20-3: Liste der im Arbeitskreis Klein synthetisierten Platinkomplexe des Typs [Pt(cod)(Me)(CCR)] .....	169
Tab. 20-4: Temperatur-/Zeitprogramm für Titanmessungen .....	173
Tab. 20-5: Temperatur-/Zeitprogramm für Platinmessungen .....	174
Tab. 20-6: Verdünnungsschema für die Testsubstanzen .....	176
Tab. 20-7: Plattenbelegung .....	176
Tab. 20-8: Verdünnungsschema zur Herstellung der Stammlösungen .....	179
Tab. 20-9: Programm zur Aufnahme von ctDNA-Schmelzpunktkurven. Die Daten vom Aufheizen und Kühlen wurden zur Bestimmung der Schmelztemperatur verwendet. ....	183
Tab. 20-10: Bestimmung des Extraktionspuffervolumens.....	191
Tab. 20-11: Übersicht über die Herstellung der verschiedenen Testlösungen .....	193

## Formelverzeichnis

Formel 3-1: Gibbs'sche Freie Enthalpie für die Konzentration $c$ eines Arzneistoffs der Innen- und Außenseite einer Biomembran .....	18
Formel 4-1: Reaktionsgleichung einer enzymatischen Reaktion (E: Enzym, S:Substrat, P:Substrat, $k_{\text{kat}}$ : katalytische Konstante) .....	29
Formel 4-2: Definition der katalytischen Konstante $k_{\text{kat}}$ ( $V_{\text{max}}$ : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion, $[E]_{\text{total}}$ : Gesamtenzymkonzentration) .....	30
Formel 4-3: Zusammenhang der Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion mit der Substratkonzentration beschrieben als sog. Michaelis-Menten-Gleichung ( $V_{\text{max}}$ : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion, $K_m$ : Michaelis-Konstante, $[S]$ : Substratkonzentration) .....	30
Formel 4-4: Katalytische Wirksamkeit von Enzymen ( $k_{\text{kat}}$ : katalytische Konstante, $K_m$ : Michaelis-Konstante, $k_n$ : Geschwindigkeitskonstante der Reaktion) .....	31
Formel 6-1: Lambert-Beer'sche Gesetz ( $A_\lambda$ : Absorption, $I_0$ : eingestrahlte Lichtintensität, $I$ : abgeschwächte Lichtintensität, $c$ : Konzentration, $b$ : Schichtdicke) .....	50
Formel 14-1: Therapeutische Breite ( $LC_{50}$ : mittlere letale Konzentration, $EC_{50}$ : mittlere effektive Konzentration) .....	124
Formel 20-1: Nachweisgrenze .....	172
Formel 20-2: Bestimmungsgrenze .....	172
Formel 20-3: Berechnung von $T/C_{\text{kor}}$ .....	177
Formel 20-4: Berechnung der Proteinbindung .....	184

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	-	Atomabsorptionsspektrometrie
AcCl	-	Acetylchlorid
ADP	-	Adenosindiphosphat
AEBSF	-	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
Äq.	-	Äquivalente
ATP	-	Adenosintriphosphat
AUC	-	Fläche unter der Kurve
$A_\lambda$	-	Absorption
b	-	Schichtdicke
BSA	-	Rinderserumalbumin
c	-	Konzentration
CCD	-	ladungsgekoppeltes Bauteil
CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	deuteriertes Dichlormethan
CDCl <sub>3</sub>	-	deuteriertes Chloroform
cod	-	1,5-Cyclooctadien
ctDNA	-	DNA aus dem Kalbsthymus
Cys	-	Cystein
DM	-	Deutsche Mark
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (standardisiertes Nährmedium für Zellkultur)
DMF	-	Dimethylformamid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dt.	-	deutsch

DTNB	-	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	-	Dithiothreitol
E	-	Enzym
EC <sub>50</sub>	-	mittleren effektiven Konzentration
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EG-GMP	-	europäische Leitfaden zur guten Herstellungspraxis
EGTA	-	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
engl.	-	englisch
ES	-	Enzym-Substrat-Komplex
Et	-	Ethyl
Et <sub>2</sub> NH	-	Diethylamin
EtOH	-	Ethanol
F-AAS	-	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie
FAD	-	oxidierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH <sub>2</sub>	-	reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	-	fetales Kalbserum
GF-AAS	-	Graphitrohrfen-Atomabsorptionsspektroskopie
GMP	-	Gute Herstellungspraxis
GPx	-	Glutathionperoxidase
GR	-	Glutathionreduktase
GSH	-	reduzierte Form des Glutathion
GSSG	-	oxidierte Form des Glutathion (Dimer)
GST	-	Glutathion-S-Transferase
GTR	-	Glutaredoxinreduktase
HEPES	-	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

His	-	Histidin
hpf	-	Stunden nach der Befruchtung
HR-CS AAS	-	Hochauflösende Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumstrahler
HSAB	-	Konzept der „harten und weichen Säuren und Basen“
HT-29	-	humane Darmkrebszelllinie
I	-	Lichtintensität
IC <sub>50</sub>	-	mittlere inhibitorische Konzentration
ICP-MS	-	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-OES	-	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IR	-	Infrarot
k <sub>kat</sub>	-	Katalytische Konstante
K <sub>M</sub>	-	Michaelis-Konstante
k <sub>n</sub>	-	Geschwindigkeitskonstante
KOtBu	-	Kalium-tert-butanolat
L-929	-	Mausfibroblasten
LC <sub>50</sub>	-	mittlere letale Konzentration
LD <sub>50</sub>	-	mittlere letale Dosis
LOD	-	Nachweisgrenze
LOQ	-	Bestimmungsgrenze
MCF-7	-	humane Brustkrebszelllinie
Me	-	Methyl
MeOH	-	Methanol
mtDNA	-	mitochondriale DNA
M <sub>w</sub>	-	Molekulargewicht
MW	-	Mittelwert

n	-	Anzahl der Bestimmungen
n/a	-	nicht bestimmt
NADP	-	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH+H <sup>+</sup>	-	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	-	Kernresonanz-Spektroskopie
ox	-	oxidierte Form
P	-	Produkt
Ph	-	Phenyl
pH	-	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pK <sub>s</sub>	-	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
ppm	-	Teile pro Million (engl. <i>parts per million</i> )
PTU	-	Polythiouracil
Py	-	Pyridyl
r <sup>2</sup>	-	Korrelationskoeffizient
red	-	reduzierte Form
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	-	Raumtemperatur
S	-	Substrat
Salan	-	Diaminobisphenolato
SeCys	-	Selenocystein
Stabw.	-	Standardabweichung
t <sub>1/2</sub>	-	Halbwertszeit
T	-	Temperatur
THF	-	Tetrahydrofuran

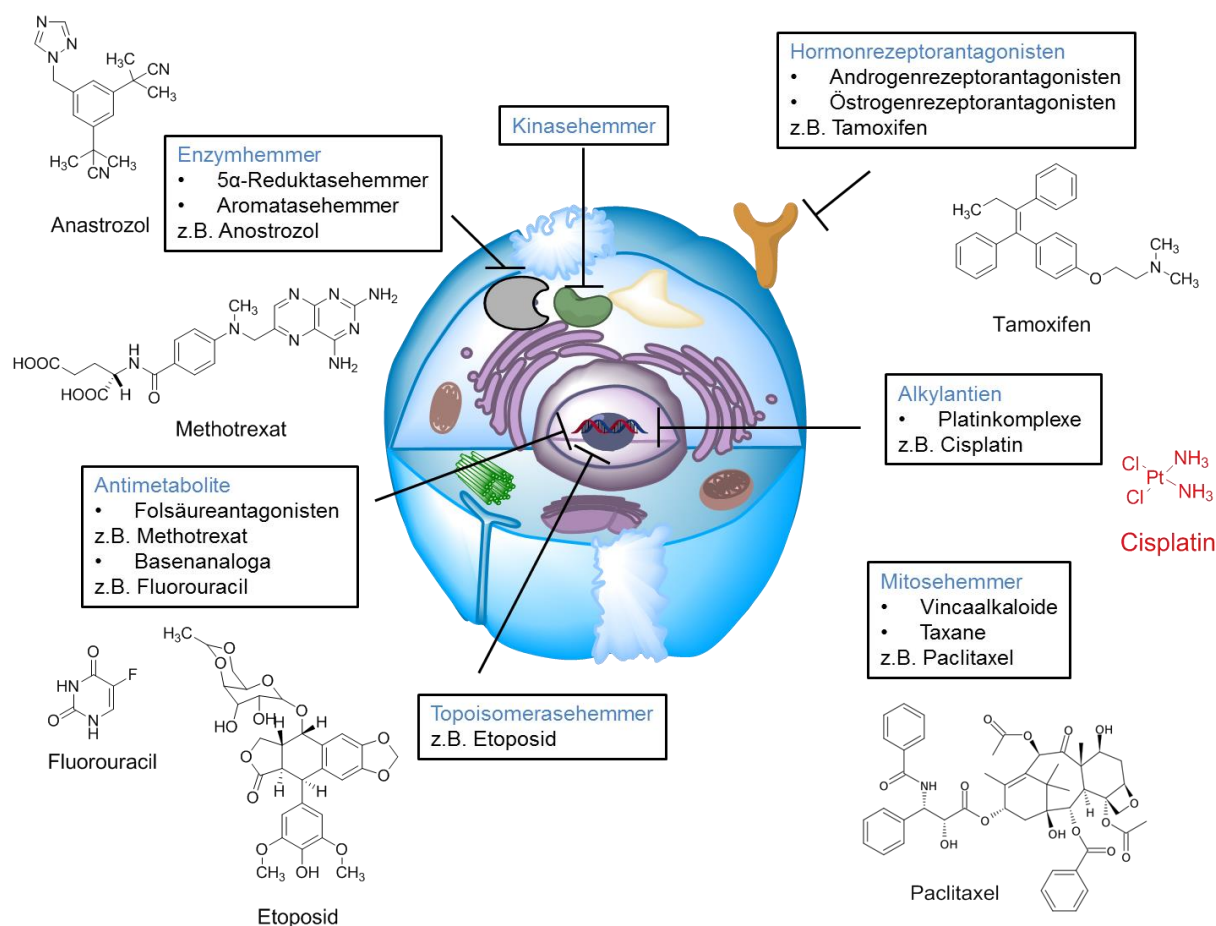
Ti-Y	-	Titanocen Y
T <sub>m</sub>	-	Schmelztemperatur
TNB	-	5-Thionitrobenzoesäure
Trx	-	Thioredoxin
TrxR	-	Thioredoxinreduktase
TXRF	-	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
URL	-	einheitlicher Quellenanzeiger (engl. <i>Uniform Resource Locator</i> )
UV	-	ultraviolettes Licht
UV/Vis	-	ultravioletten und sichtbaren Lichts
v <sub>max</sub>	-	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
λ	-	Wellenlänge
σ <sub>B</sub>	-	Standardabweichung



# I Einleitung

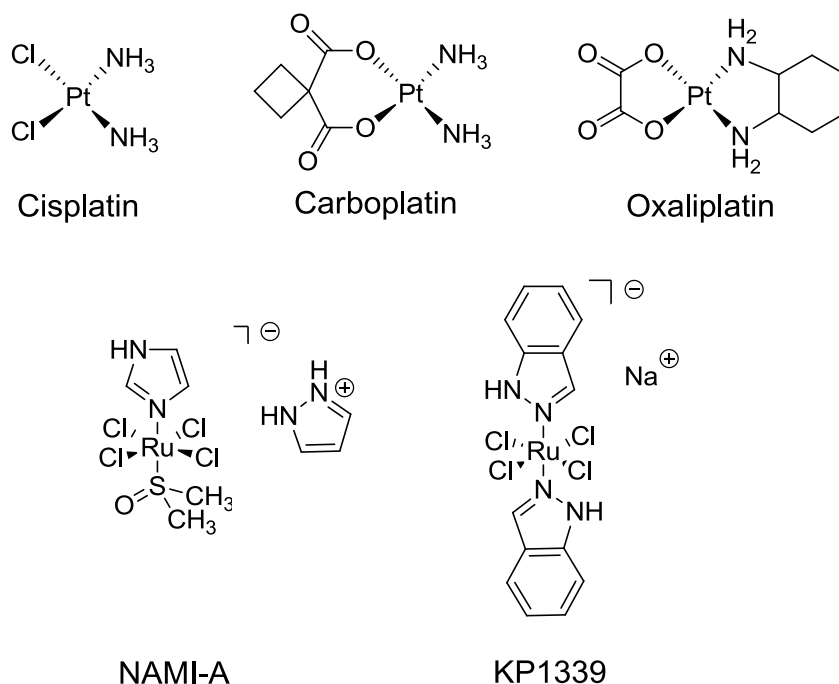
# 1. Metallkomplexe in der Tumorthherapie

Antitumorwirkstoffe, sog. Zytostatika hemmen die Zellteilung und den Zellstoffwechsel und führen somit zum Absterben der Zelle. Die Angriffsorte der Zytostatika sind dabei vielfältig (siehe Abb. 1-1). Alkylantien, Antimetabolite und Topoisomerasehemmer greifen in den DNA-Stoffwechsel ein. Für die Aromatasehemmer, Kinasehemmer und 5 $\alpha$ -Reduktasehemmer sind verschiedene Enzyme der Zelle das Zielmolekül, das sog. Target. Hormonrezeptorantagonisten hemmen Biomoleküle, die eine Rezeptorfunktion ausüben. Einen anderen Wirkmechanismus haben die Mitosehemmer, die die Teilung der Zelle unterbinden.



der Platinkomplexe, das Cisplatin (siehe Abb. 1-2), wurde in den 1960er Jahren von Rosenberg *et al.* für den Einsatz als Zytostatikum entdeckt und wird seitdem weltweit in der Antitumorthherapie eingesetzt [1, 2]. Der Einsatz von anorganischen, metallhaltigen Wirkstoffen in der modernen Medizin für die Behandlung von Krankheiten war zu dieser Zeit ein Novum. Berichte über die therapeutische Verwendung von Metallen gab es bei einem Blick in die Geschichte schon lange vor Christus (siehe 1.2).

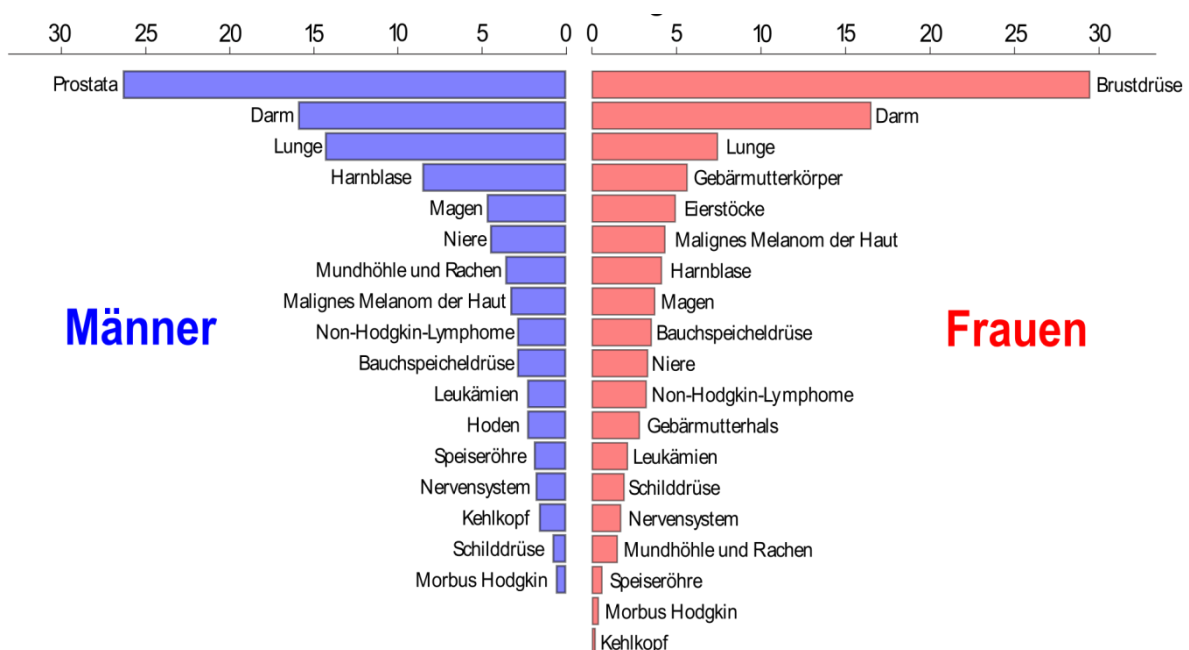
Auch fast 50 Jahre nach ihrer Entwicklung gehören die Platinkomplexe heutzutage zu den am meisten eingesetzten Antitumorwirkstoffen. Dennoch können nur bestimmte Tumorarten mit diesen Wirkstoffen behandelt werden und die Patienten leiden unter den starken Nebenwirkungen der Chemotherapie. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind insbesondere das starke Erbrechen, die Hör- und Nierenschäden sowie die Schäden am blutbildenden System zu nennen. In der frühen Vergangenheit kam es zudem vermehrt zum Auftreten von Resistenzen unter der Therapie mit Platinkomplexen. [3–7] Diese Nachteile der Platinkomplexe haben Forscher dazu veranlasst, auch Metallkomplexe mit anderen Metallen als Zentralatom zu entwickeln und diese auf ihre antiproliferativen Eigenschaften zu untersuchen. Bis heute haben es trotz starker Bemühungen nur wenige Metallkomplexe ohne Platin als Zentralatom zu einer Marktzulassung geschafft. Aktuell befinden sich jedoch zwei vielversprechende Ruthenium-basierte Komplexe in der klinischen Prüfung (NAMI-A und KP-1339, siehe Abb. 1-2).



**Abb. 1-2: Metallkomplexe in der Tumorthherapie oder klinischen Prüfung**

## 1.1 Krebsentstehung und -inzidenz

Nach Herz-Kreislaufkrankungen sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, an den jährlich circa 220.000 Menschen sterben und etwa 500.000 Menschen neu erkranken [8]. Die Lokalisation der Neuerkrankungen unterliegt einer geschlechterspezifischen Verteilung (siehe Abb. 1-3). Für Männer ist Prostatakrebs die häufigste Krebsform, für Frauen der Brustkrebs. An zweiter Stelle steht bei Mann und Frau der Darmkrebs, gefolgt vom Lungenkrebs an dritter Stelle. Da die Menschen immer älter werden und die Häufigkeit der Krebserkrankungen mit dem Alter zunimmt, ist in den nächsten Jahren von einer Steigerung der Krebsneuerkrankungen auszugehen, wie auch aus dem aktuellen Welt-Krebs-Bericht 2014 der Weltgesundheitsorganisation hervorgeht [9].



**Abb. 1-3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2006 [Wikipedia Commons, file: „Krebsneuerkrankungen\_2006\_01.svg“]**

Krebserkrankungen entstehen, wenn sich gesunde Zellen durch genetische Veränderungen, z.B. durch Strahlen oder chemische Substanzen, in Tumorzellen umwandeln. Die Umwandlung kann auch rein zufällig geschehen und führt erst bei einer Kombination von mehreren genetischen Veränderungen und der Fehlfunktion des Reparatursystems der Zelle zu einer unkontrollierten Zellteilung. Die unkontrollierte Zellteilung lässt Tumore entstehen, die sich auf umliegendes Gewebe ausbreiten und

dieses verdrängen oder zerstören. Die Ausbreitung auf andere Organe erfolgt über den Blutkreislauf, wenn der Tumor durch Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) an dieses angeschlossen wird. Tochtertumore in anderen Organen werden als Metastasen bezeichnet. Eine Heilung in diesem Stadium ist meist nicht mehr möglich. Es gilt daher: je früher ein Tumor entdeckt wird, desto größer sind die Heilungschancen.

Dank umfangreichen Krebsvorsorgeuntersuchungen ist es heute möglich, die Tumorentstehung schon sehr früh zu entdecken und die Krebserkrankung schon in frühem Stadium zu behandeln. Betrachtet man einmal die oben genannten Zahlen der Krebsmortalität und Krebsneuerkrankung genauer, so lässt sich heutzutage eine Überlebensrate von circa 55 % berechnen. Vor 1980 starben dagegen noch rund 70 % aller Krebspatienten. Neben der verbesserten Früherkennung haben sich seitdem auch die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten enorm verbessert. Trotzdem besteht nach wie vor ein hoher Bedarf nach alternativen Arzneistoffen, um die Therapie für die Patienten erträglicher zu machen, die Mortalität weiter zu senken und den erwarteten Anstieg der Krebsneuerkrankungen abzufangen.

## **1.2 Von Antiinfektiva zu Antitumorwirkstoffen: Geschichte der medizinischen Verwendung von Metallen**

Schon viele Tausend Jahre vor Christus verwendeten die Ägypter Kupfer, um Wasser zu sterilisieren und die Chinesen Gold zur Behandlung von Krankheiten. In der Renaissance wurde Quecksilber als Diuretikum eingesetzt, was sich noch bis 1950 fortsetzte. Auch der Arzt und Alchemist Paracelsus war von der Verwendung von Metallen zur Therapie von verschiedenen Leiden überzeugt [10]. Zum breiteren Einsatz eines Metallkomplex kam es das erste Mal zu Beginn des 20. Jahrhunderts als Salvarsan®, eine Arsenverbindung, aufgrund der von Ehrlich entdeckten antimikrobiellen Eigenschaften zur Behandlung der Syphilis verwendet wurde [11]. Zu Ehren Ehrlichs und zur Verdeutlichung der Relevanz dieser Entdeckung zu der damaligen Zeit wurden ein Bild von Paul Ehrlich sowie die damals angenommene Struktur des Salvarsan® auf den 200 DM-Schein gedruckt (siehe Abb. 1-4). Der Ruhm von Salvarsan® dauerte, bis ein paar Jahre später das Penicillin von Fleming *et al.* für die Behandlung von Infektionen entdeckt wurde, an [12]. Neben der Arsenverbindung wurden etwa zur selben Zeit Goldcyanid zur Tuberkulosetherapie und eine Antimonverbindung gegen Leishmaniose eingesetzt. Im Jahre 1929 wurde erstmals eine

Goldverbindung zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Dieses Therapiekonzept wird noch heute angewandt. Bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts beschränkte sich der Einsatz von Metallen und Metallverbindungen auf die Behandlung von Infektionskrankheiten.

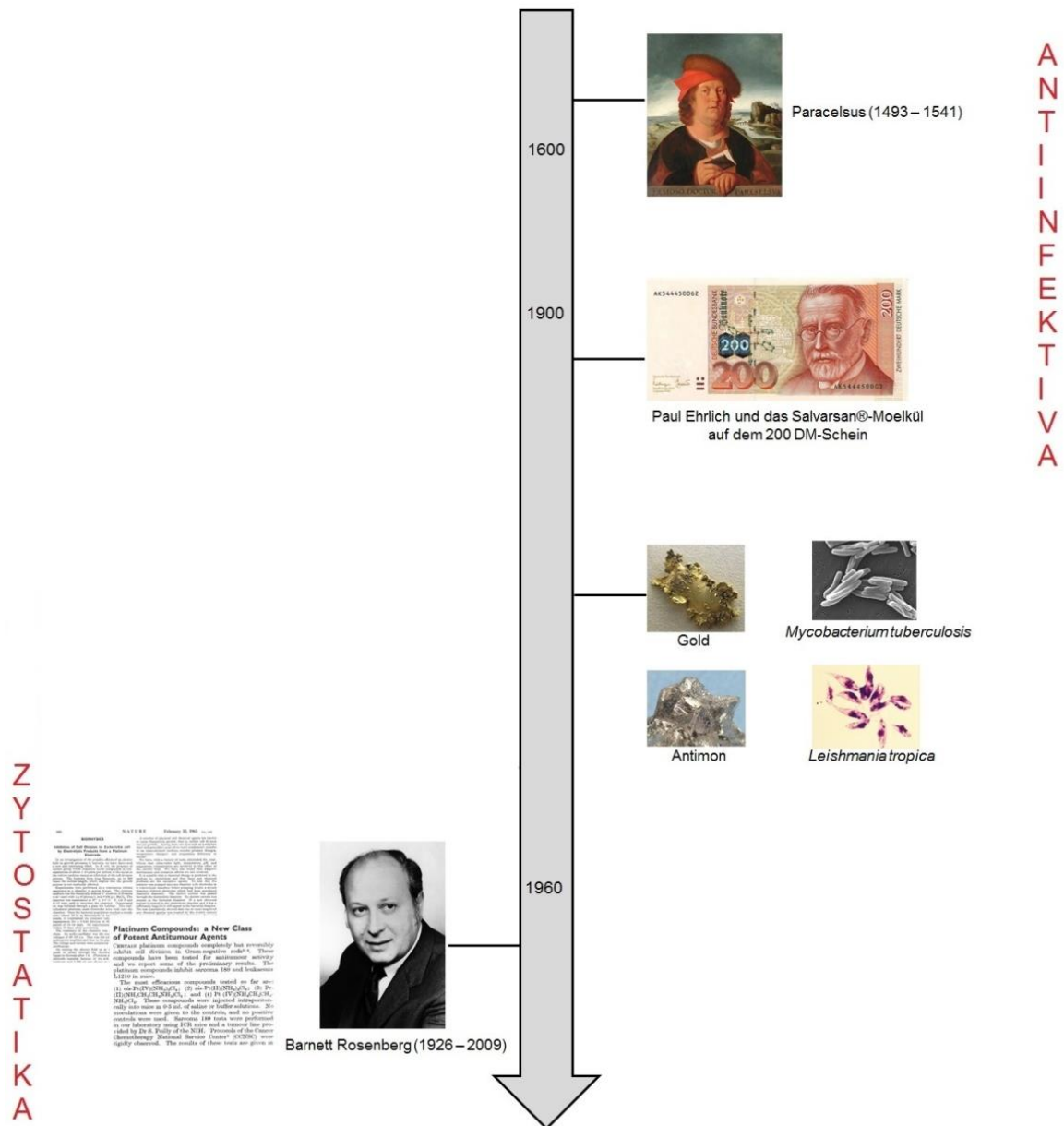


Abb. 1-4: Zeitleiste zur medizinischen Verwendung von Metallen

Die moderne Ära der Therapie von Krebserkrankungen wurde in den 1940er Jahren mit der klinischen Prüfung eines N-Lost-Derivats, eine Abwandlung der aus dem ersten Weltkrieg bekannten Senfgasen, eingeleitet. Die N-Loste sind die ersten zur

Krebstherapie eingesetzten Zytostatika. Sie werden noch heute, meistens in Kombination mit anderen Zytostatika, verwendet. In den 1950er und 1960er Jahren wurden die antiproliferativen Eigenschaften anderer organischer Verbindungen wie Alkylantien, Antimetabolite und Vinkaalkaloide entdeckt. Doch erst die zufällige Entdeckung der anorganischen Verbindung Cisplatin als wirksames Zytostatikum im Jahre 1969 [1, 2] zeigte, dass auch anorganische, metallbasierte Substanzen eine antiproliferative Wirksamkeit besitzen können und als Antitumorwirkstoffe in Betracht kommen. Dieses Wissen führte dazu, dass das Forschungsgebiet der metallbasierten Wirkstoffe expandierte und andere Metallkomplexe auf ihre Antitumoreigenschaften untersucht wurden. Dabei wurde schnell klar, dass in den Metallkomplexen ein hohes Potential für den Einsatz als Antitumorwirkstoffe steckt.

### **1.3 Beispiele neuer Strategien für metallbasierte Antitumorwirkstoffe**

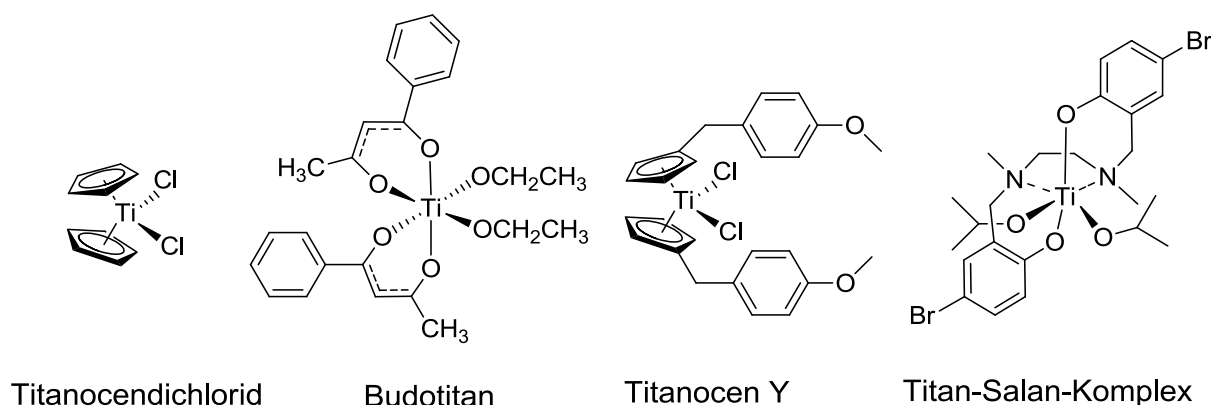
Metallbasierte Wirkstoffe besitzen im Vergleich zu den gewöhnlichen organischen Arzneistoffen aufgrund der verschiedenen möglichen Koordinationszahlen und Geometrien, der unterschiedlichen Redoxzuständen, sowie der strukturellen Vielfalt durch Ligandensubstitution ein hohes Potential für die Entwicklung neuartiger Arzneistoffe. Dieses Potential versuchen Forscher seit der Entdeckung des Cisplatins vor über 40 Jahren durch Erweiterung der Forschung auf andere Metallatome und andere Ligandentypen auszuschöpfen. Das Ziel ist es, neue Arzneistoffe mit anderen Wirkmechanismen zu entwickeln, die nicht die Nachteile der bisherigen Antitumorthherapie besitzen und die Cisplatin-Resistenzen zu überwinden.

#### **1.3.1 Antitumoraktive Titan(IV)-Komplexe**

Neben den Rutheniumkomplexen, die nach den Platinkomplexen die meist untersuchten Komplexe in der medizinischen Chemie sind [13–15], erzielten zwei Titankomplexe vielversprechende präklinische Ergebnisse und erreichten als erste Metallkomplexe nach der Platin-Ära in den 1990er Jahren die klinische Prüfphase. Die Chemie des Titan(IV)-Ions unterscheidet sich von der Platinchemie. Als Beispiel sei hier erwähnt, dass Platin bevorzugt an den Stickstoff der DNA-Basen bindet, wohingegen Titan eine höhere Affinität zum Phosphatrückgrat aufweist [16]. Diese unter-

schiedlichen Eigenschaften lassen andere biologische Eigenschaften sowie andere Targets vermuten.

Bei den bereits klinisch geprüften Titankomplexen handelt es sich um das von Kepp-  
ler *et al.* entwickelte Budotitan und das erstmals von Köpf *et al.* auf antiproliferative  
Eigenschaften getestete Titanocendichlorid (siehe Abb. 1-5) [17, 18].



**Abb. 1-5: Titankomplexe in der klinischen Prüfung und Forschung**

## Budotitan

Der Titankomplex Budotitan ist ein Benzyl-substituiertes Titanocenderivat und der erste Nicht-Platinkomplex, der in klinischer Prüfung getestet wurde. Er zeigte *in vivo* eine Aktivität gegen eine breite Vielfalt von Tumoren [18–20]. Die höchste Aktivität wurde gegen Darmkrebs berichtet. In der klinischen Prüfung zeigten sich Löslichkeitsprobleme des Budotitan, so dass der Komplex nur in einer speziellen Formulierung, einer Mischung aus Glycerin, Glykol und Wasser, verwendet werden konnte, um den Komplex vor vorzeitiger Hydrolyse zu schützen [18, 20]. Die schnelle Hydrolyse zu einem wasserunlöslichen Produkt ( $t_{1/2} = 20$  s) ist der größte Nachteil dieses Titankomplexes, der in letzter Konsequenz zum Abbruch der klinischen Prüfphase geführt hat. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Budotitan wurden nicht durchgeführt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Budotitan mit Biomolekülen über kovalente Bindungen interagiert oder in die DNA über den aromatischen Ring interkaliert [21].

## Titanocendichlorid

Der Titankomplex Titanocendichlorid ähnelt in seiner Struktur dem Cisplatin, da es ebenfalls zwei Chlorido-Liganden besitzt. Charakteristisch sind außerdem die Cyclo-



pentadienyl-Liganden, die diesen Komplex zu einem Sandwichkomplex machen. Sandwichkomplexe sind metallorganische Verbindungen, die zwei parallele, planare, zyklische organische Liganden tragen. Bei Komplexen mit zwei Cyclopentadienyl-Liganden spricht man im Speziellen von Metallocenen. Der bekannteste Vertreter der Metallocene ist das Ferrocen, welches im Jahre 1951 als erstes Metallocen zufällig entdeckt wurde [22]. Den ersten Bericht über die antiproliferativen Eigenschaften des Titanocendichlorids gab es im Jahre 1979 von Köpf *et al.* [17]. Titanocendichlorid war *in vivo* aktiv gegen verschiedene Tumorarten, u.a. Lungen-, Darm- und Brustkrebs, und zeigte *in vitro* eine Wirksamkeit in Cisplatin-resistenten Zelllinien [23, 24]. Im Gegensatz zu Cisplatin kam es unter der Therapie nicht zu Nieren- oder Blutbildschäden [23, 25]. In der klinischen Prüfphase II erfolgte wegen des schlechten Verhältnisses von Effektivität und Toxizität für Titanocendichlorid der Studienabbruch [26–28]. Die Ursache für die verminderte Effektivität war ähnlich des Budotitans die geringe hydrolytische Stabilität. Titanocendichlorid bildete, wie aufgrund der elektronenarmen und sauerstoffliebenden Natur des Titan(IV)-Ions erwartet, in Wasser schnell wasserunlösliche Aggregate, z.B. Titandioxid, aus. Eine detaillierte Untersuchung zum Hydrolyseverhalten des Komplexes wurde von Toney *et al.* publiziert [29]. Die Hydrolyse der beiden Chlorido-Liganden erfolgte nach circa 50 Minuten. Die Hydrolyse der Cyclopentadienyl-Liganden war mit circa 54 Stunden langsamer.

Trotz der vielversprechenden präklinischen Studien und der großen Erwartungen konnten die beiden Titankomplexe Budotitan und Titanocendichlorid in der klinischen Prüfphase nicht überzeugen. Die aktuelle Forschung der medizinischen Chemie von Titankomplexen beschäftigt sich mit der Synthese von stabileren und besser wasserlöslichen Komplexen. Im Wesentlichen werden dafür mehrzählige Liganden, sog. Chelatoren, verwendet. In Abb. 1-5 sind neben den beiden bereits klinischen geprüften Titankomplexen zwei neuartige Titan(IV)-Komplexe dargestellt: das Titanocen Y und ein Vertreter der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe.

### **Titanocen Y**

Bei Titanocen Y handelt es sich ebenfalls um einen Sandwichkomplex, der sich von Titanocendichlorid nur durch einen zusätzlichen *p*-Methoxybenzyl-Ligand am Cyclopentadienyl-Ringsystem unterscheidet. Diese Modifizierung sorgt für eine bessere Wasserlöslichkeit und hydrolytische Stabilität des Titanocen Y im Vergleich zum Titanocendichlorid. Der Komplex wurde von Tacke *et al.* im Jahre 2005 erstmals syn-

thetisiert und zeigte eine wesentlich stärkere *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität als Titanocendichlorid und ein besseres Nebenwirkungsprofil als Cisplatin [30–36].

### **Titan-Salan-Komplexe**

Beim Titan-Salan-Komplex in Abb. 1-5 handelt es sich um einen Vertreter einer neuen Familie von Titan(IV)-Komplexen mit einem Diaminobisphenolato(„Salan“)-Ligand, die von Tshuva *et al.* entwickelt wurden [37]. Diese Komplexfamilie ist aufgrund von zwei Eigenschaften sehr interessant:

1. Sie besitzen eine höhere *in vitro*-Toxizität als Titanocendichlorid und Cisplatin und sie ist abhängig von den Ligandeigenschaften.
2. Die aktiven Komplexe besitzen eine hohe hydrolytische Stabilität mit Halbwertszeiten über mehrere Stunden bis Tage.

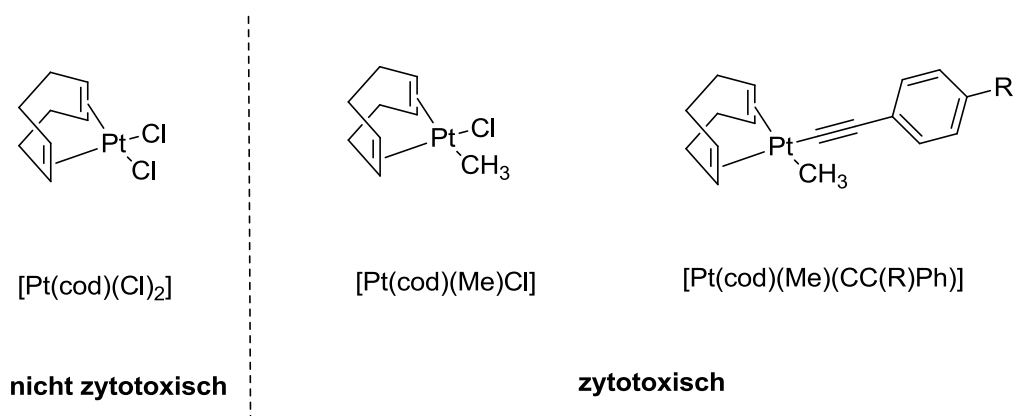
Neben den chemischen und antiproliferativen Eigenschaften der neuen Titan(IV)-Komplexe ist bisher nur wenig über ihre biologischen Eigenschaften und den Wirkmechanismus bekannt.

### **1.3.2 Organometallische Platin(II)-Komplexe als Antitumorwirkstoffe**

Platinkomplexe sind das Mittel der Wahl in der Chemotherapie. Cisplatin und die Platinkomplexe der 2. Generation Carboplatin und Oxaliplatin, die entwickelt wurden um die bekannten Nebenwirkungen des Cisplatins [38, 39] zu reduzieren, werden weltweit eingesetzt. Neben den genannten Platinkomplexen wurden noch zahlreiche andere Platinverbindungen synthetisiert und auf ihre Antitumoreigenschaften getestet [40]. Obwohl die präklinischen Ergebnisse häufig vielversprechend waren, wurden jedoch die klinischen Prüfungen stets aufgrund von hoher Toxizität und/oder geringer Wasserlöslichkeit abgebrochen.

Der Wirkmechanismus der drei zur Therapie eingesetzten Platinkomplexe beruht auf einer kovalten Interaktion mit der DNA im Zellkern, die letztendlich die Tumorzellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Um ihre Wirkung zu entfalten, werden die Komplexe in der Zelle durch Wasserkomplexierung aktiviert. Die Nachteile der genannten Platinverbindungen sind ihre starken Nebenwirkungen wie Nieren- und Ohrentoxizität [38, 39]. Außerdem ist das Auftreten von Resistenzen ein Problem [41]. Auch wenn schon zahlreiche Platinkomplexe mit den unterschiedlichsten Ligan-

den synthetisiert wurden, beherbergt die Organometallchemie noch einen großen Pool an potentiellen Liganden. Organometall-Komplexe besitzen den Vorteil, dass die Metall-Kohlenstoff-Bindung unter physiologischen Bedingungen stabil ist und dass die organischen Liganden leicht variiert werden können. Organische Platin(II)-Komplexe mit 1,5-Cyclooctadien(cod)-Liganden, die seit Jahrzehnten in der Katalyse bekannt sind [42], können mit verschiedenen elektronenreichen, organischen Koliganden koordinieren [43–46]. Hydrophobe Liganden, wie z.B. 1,5-Cyclooctadien, die den Komplex schlechter wasserlöslich machen, müssen jedoch nicht zwangsläufig zu einer verminderten antiproliferativen Aktivität führen, wie Mock *et al.* in ihren Untersuchungen an Platin(II)-Komplexen feststellte [47]. Auch Komiya *et al.* konnten eine hohe Zytotoxizität von organometallischen cod-Platin-Komplexen zeigen [48]. Die anorganische Vorstufe dieser Komplexe  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Cl})_2]$  war dagegen nicht zytotoxisch in Tumorzelllinien, wie Butsch *et al.* und Cullinane *et al.* berichteten [46, 49]. Klein *et al.* synthetisierte kürzlich eine neue Substanzklasse der cod-Platin-Komplexe mit Alkin-Koliganden, die in ersten Experimenten ebenfalls vielversprechende Antitumoreigenschaften zeigten (siehe Abb. 1-6) [44].



**Abb. 1-6 Platinkomplexe mit 1,5-Cyclooctadien(cod)-Liganden**

Platin(II)-Komplexe sind isoelektronisch und isostrukturell zu Gold(III)-Komplexen. Aus der Literatur sind einige organometallische Gold(III)-Komplexe mit einer Wirksamkeit gegen Cisplatin-resistente Zelllinien bekannt, was auf ein anderes Target als die DNA hinweist und neue Möglichkeiten für die Krebstherapie eröffnet.

## 2. Zielsetzung

Die neuen Titan(IV)-Komplexe mit Cyclopentadienyl- und Salan-Liganden sowie die neuen Platin(II)-Komplexe mit Alkynyl-Liganden besitzen aufgrund ihrer andersartigen chemischen Struktur, im Vergleich zu bekannten Titan(IV)- und Platin(II)-Komplexen, und ihren zytotoxischen Eigenschaften ein hohes Potential für den Einsatz als Antitumorwirkstoffe. Der Wirkmechanismus dieser Komplexe sowie weitere biologische Eigenschaften sind bisher unbekannt. Für die Weiterentwicklung dieser Komplexe sowie den möglichen Einsatz als Zytostatikum ist das Wissen über die biochemischen Eigenschaften sowie der Bioverteilung dieser neuen Substanzklassen unbedingt notwendig. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit Experimente zur Aufklärung des unbekannten Wirkmechanismus durchgeführt werden. Die Arbeit ist dazu in zwei Projekte gegliedert.

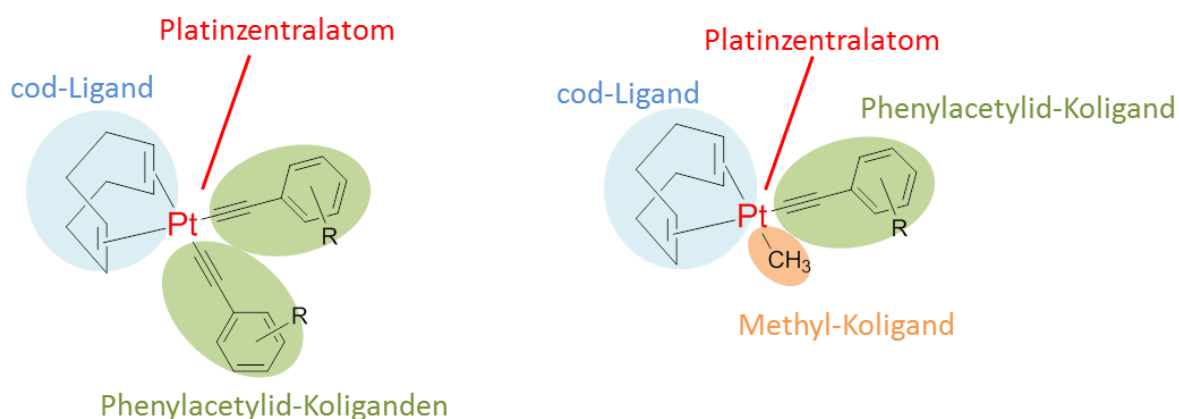
### **Projekt A: Biochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus von neuartigen Titan(IV)-Komplexen**

Für die präklinischen Untersuchungen der neuartigen Titan(IV)-Komplexe wurden zwei repräsentative Vertreter mit Cyclopentadienyl- und Salan-Liganden ausgewählt, die mit Titanocendichlorid als Referenz hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden sollen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die neuartigen Titankomplexe zytotoxisch auf verschiedene Tumorzelllinien wirken. Mit weiterführenden toxikologischen Untersuchungen soll die Antitumoraktivität anhand von  $IC_{50}$ -Werten beschrieben werden. Außerdem sollen innerhalb der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgedeckt werden. Durch das Einbeziehen von gesunden Zelllinien soll außerdem die selektive Wirkung der Titankomplexe auf Tumorzellen charakterisiert werden. Einen ersten Hinweis auf die unspezifische Toxizität der Komplexe auf den Gesamtorganismus geben *in vivo*-Untersuchung in Zebrafischembryos. Bindungsstudien mit DNA und Albumin sollen die Bindungseigenschaften der Titankomplexe genauer beschreiben und klären, ob die DNA als mögliches Target in Betracht kommt. Für die weitere Aufklärung möglicher Targets bedarf es der Kenntnis über die Bioverteilung der Titankomplexe. Hier sind insbesondere Zellaufnahmestudien relevant, die zeigen sollen, ob ein intrazelluläres Target wahrscheinlich ist und ob die Antitumoraktivitäten der Titankomplexe

von unterschiedlichen intrazellulären Titankonzentrationen bestimmt werden. Auch der Einfluss der Bindungsaffinität zum Albumin und dessen Relevanz auf das Zellaufnahmeverhalten der Titankomplexe sollen genauer beleuchtet werden. Für die Untersuchung der intrazellulären Bioverteilung sollen aus den Tumorzellen einzelne Zellorganellen (Zellkerne und Mitochondrien) isoliert und auf ihren Titangehalt untersucht werden, um die Lokalisation der Komplexe in der Zelle genauer zu beschreiben. Die Ergebnisse der Zellaufnahme und intrazellulären Verteilung sollen in Zusammenhang mit den Bindungseigenschaften der Titankomplexe gebracht und im Hinblick auf einen möglichen DNA-basierten Wirkmechanismus diskutiert werden. Für die quantitative Bestimmung der geringen Titankonzentrationen in biologischem Material soll zuvor eine auf der Atomabsorptionsspektrometrie basierende Methode entwickelt werden.

### Projekt B: Synthese und biologische Eigenschaften von Platin(II)-Alkynyl-Komplexen

Ausgewählte Platin(II)-Alkynyl-Komplexe (Wirkstoffdesign, siehe Abb. 2-1) sollen synthetisiert und charakterisiert werden. Die synthetisierten Platinkomplexe sollen zusammen mit bereits hergestellten Platin-Alkynyl-Komplexen auf ihre Antitumoraktivität untersucht werden. Außerdem soll überprüft werden, ob das Ausmaß der Antitumoraktivität abhängig von der Struktur des Alkynyl-Liganden ist.



**Abb. 2-1: Wirkstoffdesign der Platin(II)-Alkynyl-Komplexe (links: Dialkynyl-Komplexe, rechts: Alkyl/Alkynyl-Komplexe)**

Mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollen über die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte beschrieben werden. Für Platinkomplexe wird die DNA als Target angenommen. In zwei verschiedenen Bindungsexperimenten soll untersucht werden, ob für die Platin-

Alkynyl-Komplexe ebenfalls ein die DNA betreffender Wirkmechanismus in Betracht kommt. Für die weitere biochemische Charakterisierung dieser neuen Substanzklasse sollen toxikologische *in vivo*-Experimente sowie Zellaufnahmeuntersuchungen in Tumorzellen durchgeführt werden. Kürzlich wurde von der Thioredoxinreduktase, einem Enzym des antioxidativen Netzwerkes der Zelle als mögliches Target für Gold(I)-Alkynyl-Komplexe, die den *cod*-Platin-Alkynyl-Komplexen strukturell ähnlich sind, berichtet [50–55]. Es soll überprüft werden, ob Platin-Alkynyl-Komplexe ebenfalls Enzyme des antioxidativen Netzwerkes hemmen können. Möglicherweise steckt in der neuen Substanzfamilie der Platin-Alkynyl-Komplexe ein hohes Potential als Antitumorwirkstoffe mit einem für Platinkomplexe andersartigen Wirkmechanismus, der die Nachteile der bekannten Platinkomplexe überwindet.

## **II Grundlagen**

### 3. Weg des Arzneistoffs im Organismus

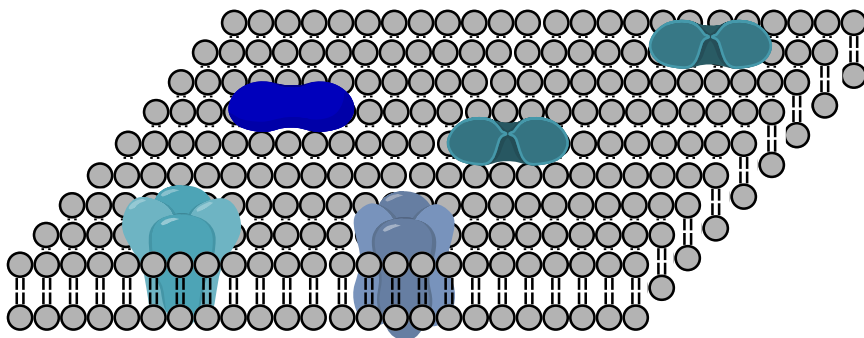
Um nach der oralen Einnahme in das Blut und an den Wirkort zu gelangen, müssen Arzneistoffe biologische Membranen passieren. Auch Arzneistoffe, die direkt in das Blut injiziert werden, müssen in der Lage sein Membranen zu überwinden, sofern sich ihr Zielmolekül innerhalb der Zelle befindet. Bekannte Antitumorwirkstoffe interagieren mit intrazellulären Targets wie DNA, Enzymen oder nukleären Rezeptoren und müssen folglich Zellmembranen passieren, um an ihr Target zu binden bzw. mit diesem zu interagieren. Die Überwindung zellulärer Barrieren auf dem Weg des Arzneistoffs durch den Organismus geschieht häufig durch passiven Transport. Daneben besitzen der aktive Transport unter Energieverbrauch und der Carrier-vermittelte Transport eine hohe praktische Relevanz für den Arzneistofftransport.

Die Molekülstruktur eines Arzneistoffs bestimmt neben der pharmakologischen Wirksamkeit und Targetspezifität seine chemisch-physikalischen Eigenschaften und damit die Membrangängigkeit des Arzneistoffs, welche in letzter Konsequenz für die Aufnahme und Verteilung des Arzneistoffs im Organismus entscheidend ist. Hochmolekulare Stoffe, wie Proteine, können Zellmembranen nicht passieren. Bei niedermolekularen Stoffen hängt die Membrangängigkeit im Wesentlichen von der Polarität ab. Sehr polare Arzneistoffe können biologische Membranen nur schwer überwinden und werden daher kaum von der Zelle aufgenommen. Besitzen polare Arzneistoffe jedoch eine Affinität zu sog. Poren oder Transportproteinen, so ist ein Carrier-vermittelter Transport durch die Zellmembran möglich. Neben den intrazellulären Targets sind auch extrazelluläre Targets, z.B. Rezeptoren an der Zelloberfläche bekannt, so dass auch nicht membrangängige Arzneistoffe eine pharmakologische Wirkung besitzen können. Ob ein Arzneistoff biologische Membranen passieren kann oder nicht, ergibt sich aus dem Aufbau von Biomembranen (siehe 3.1), der seit den Arbeiten von Singer und Nicolsen im Jahre 1972 als Flüssig-Mosaik-Modell beschrieben wird [56]. Ein Parameter, der das Abschätzen der Membrangängigkeit eines Wirkstoffs ermöglicht, ist der Diffusionskoeffizient. Je höher der Diffusionskoeffizient ist, desto höher ist die Lipophilie des Arzneistoffes und damit seine Fähigkeit die lipophile Membran zu durchdringen.



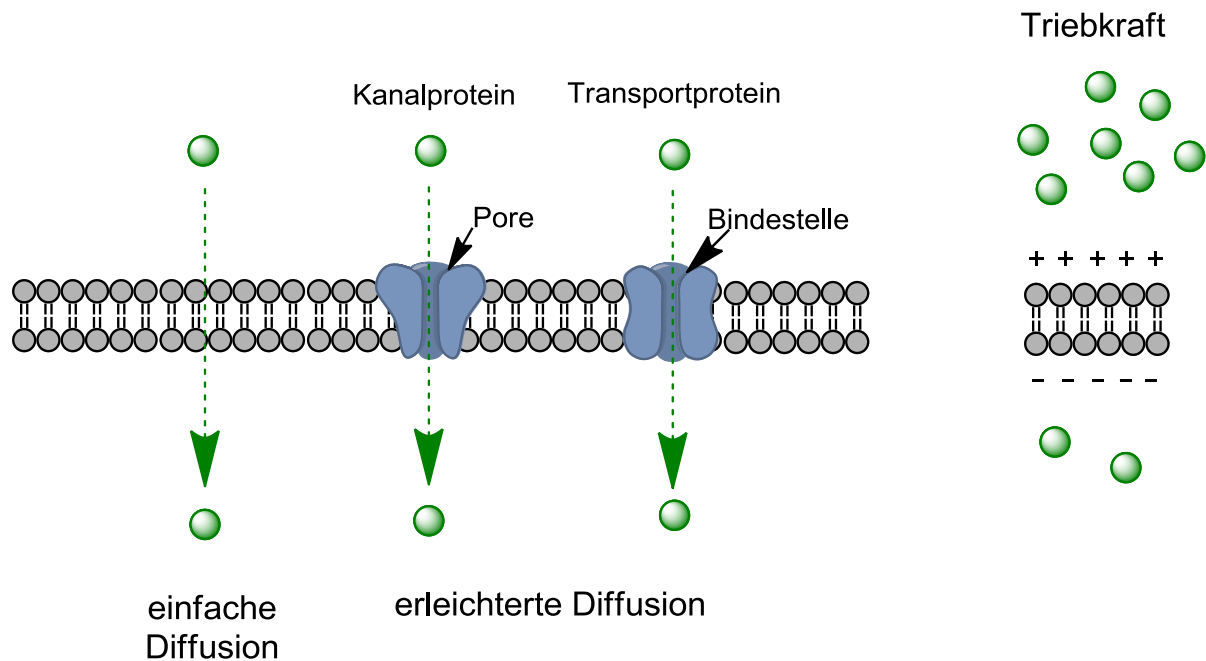
### 3.1 Transportprozesse durch Biomembranen

Biomembranen sind komplexe Trennschichten, die mehrere Bereiche einer Zelle, wie verschiedene Zellkompartimente voneinander, sowie die Zelle vom Extrazellularraum trennen. Nach Singer und Nicolson [56] bestehen Biomembranen aus einer von Phospholipiden gebildeten Lipiddoppelschicht. Phospholipide wie Phosphatidylcholin zeichnen sich durch einen hydrophilen und einen lipophilen Molekülteil aus. Bei der Ausbildung der Lipiddoppelschicht ragen die hydrophilen Molekülteile in die wässrige Außen- bzw. Innenseite, während die lipophilen Molekülteile im Membraninneren durch hydrophobe Effekte und schwache Van-der-Waals-Kräfte die Lipiddoppelschicht ausbilden. (siehe Abb. 3-1) Die Membran erhält so eine gewisse Fluidität, die durch den Gehalt an Cholesterol und ungesättigten Lipiden beeinflusst wird. In der Membran befinden sich neben Lipiden zahlreiche Proteine wie Kanalporen, Rezeptoren und Transporter. Die eingelagerten Proteine sind ebenfalls frei beweglich und „schwimmen“ in der Membran, weshalb der Aufbau von biologischen Membranen als Flüssig-Mosaik-Modell beschrieben wird. [56]



**Abb. 3-1: Aufbau einer Biomembran mit eingelagerten Proteinen (Transportern, Kanäle etc.)**

Der spezielle Aufbau gewährleistet jeder einzelnen Zelle einen kontrollierten Stofftransport und damit eine kontrollierte Umgebung. Die notwendigen Konzentrationsverhältnisse in der Zelle, die sich stark vom Extrazellularraum unterscheiden, werden durch die selektive Permeabilität der Membranen aufrechterhalten. Hydrophobe und kleine, unpolare Moleküle können den hydrophoben Kern der Membranen meist ungehindert durchwandern. Für größere oder polare Moleküle stellt dieser Kern jedoch eine unüberwindbare Barriere dar. Der Durchtritt kann für diese Moleküle nur durch spezifische Kanalproteine oder mittels Transportprotein ermöglicht werden.



**Abb. 3-2: Passiver Transport durch Biomembranen**

Die meisten Arzneistoffe gelangen durch passiven Transport in die Zelle (siehe Abb. 3-2). Der Membrandurchtritt erfolgt dabei mit dem Konzentrationsgefälle, d.h. von dem Ort der höheren zum Ort der niedrigeren Konzentration. Wirkstoffe gelangen durch einfache Diffusion oder durch Kanalproteine bzw. Carrier-vermittelten Transport mithilfe von Transportproteinen auf die andere Seite der Zellmembran. Der Transport durch biologische Membranen lässt sich mit der Gibbs'schen Freien Enthalpie, die in der folgenden Gleichung beschrieben ist, quantifizieren:

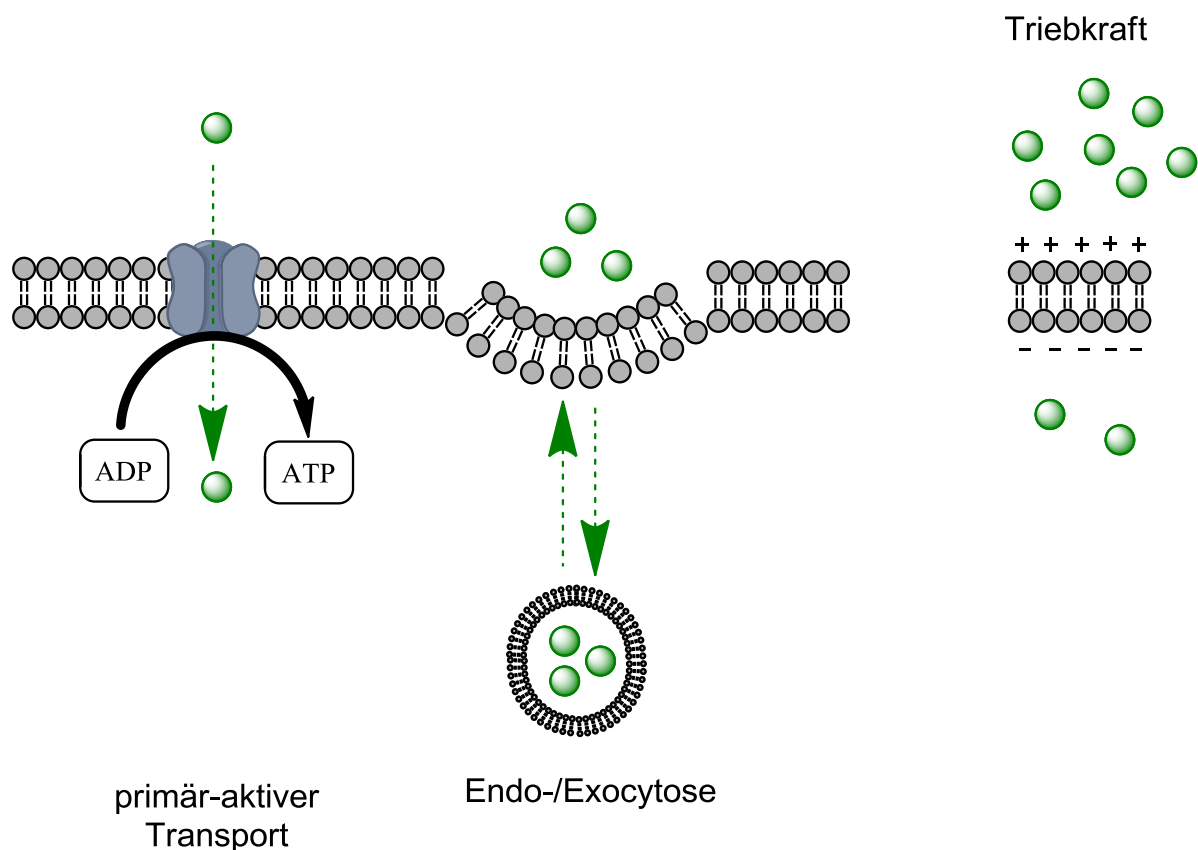
$$\Delta G = 2,303 RT \log \frac{c_{\text{innen}}}{c_{\text{außen}}}$$

**Formel 3-1: Gibbs'sche Freie Enthalpie für die Konzentration  $c$  eines Arzneistoffs der Innen- und Außenseite einer Biomembran**

Beim Transport mit dem Konzentrationsgefälle ist  $\Delta G$  negativ (da  $c_{\text{innen}} < c_{\text{außen}}$ ) und damit thermodynamisch begünstigt. Die Gleichung kann nur bei ungeladenen Molekülen angewandt werden. [57] Bei geladenen Molekülen muss noch zusätzlich das Membranpotential berücksichtigt werden [58].

Im Gegensatz zum passiven Transport ist beim aktiven Transport die Gibbs'sche Freie Enthalpie positiv, d.h. der Transport durch die Membran ist nicht thermodynamisch begünstigt und kann nur unter Energieverbrauch, meist Adenosintriphosphat(ATP)-Hydrolyse, erfolgen. [57] Bei aktiven Transportproteinen handelt es sich

um Enzyme, die neben der Substratbindestelle eine ATP-Bindestelle auf der anderen Membranseite besitzen. Nach Bindung von ATP kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, was den Transport des Substrats auf die andere Membranseite auslöst (siehe Abb. 3-3). Neben dem eben beschriebenen primär-aktiven Transport kann ein Arzneistoff auch durch Kopplung an einen passiven Transportprozess die Biomembran überwinden (sekundär-aktiver Transport, nicht dargestellt).



**Abb. 3-3: Aktiver Transport durch Biomembranen**

Die geringste Relevanz besitzt der vesikuläre Transport von Arzneistoffen. Er beruht darauf, dass der Arzneistoff vollständig von einer Membran umschlossen wird (Endocytose), als Vesikel die Biomembran passiert und auf der anderen Membranseite wieder freigesetzt wird (Exocytose). (siehe Abb. 3-3) Diese Art des Arzneistofftransports erfolgt meistens rezeptorvermittelt.

### 3.2 Bioverteilung und molekulare Erkennung von Arzneistoffen

Neben der Aufnahme in die Zelle, bei der der Arzneistoff biologische Membranen passieren muss, muss der Wirkstoff nach dessen Applikation zuerst zum gewünschten Wirkort gelangen, um mit seinem spezifischen Target zu interagieren und die pharmakologische Wirkung zu entfalten. Nach der Arzneistofffreisetzung aus der Darreichungsform (Liberation) wird dieser zunächst in die Blutbahn aufgenommen (Absorption) und im Organismus verteilt (Distribution) (siehe Abb. 3-4). Die Liberation und Absorption entfallen bei einer intravenösen Verabreichung. [59, 60] Die treibende Kraft für die Verteilung im Körper ist, ähnlich des passiven Transports von Arzneistoffen durch Biomembranen, der Konzentrationsunterschied in den unterschiedlichen Geweben und Körperflüssigkeiten. Neben der Fähigkeit der Arzneistoffe Biomembranen zu überwinden (siehe Kapitel 3.1), sind die Löslichkeit und das Bindungsvermögen an Plasmaproteine, die ebenfalls durch die chemische Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffmoleküls bestimmt werden, für die Aufnahme in die Zelle relevant.

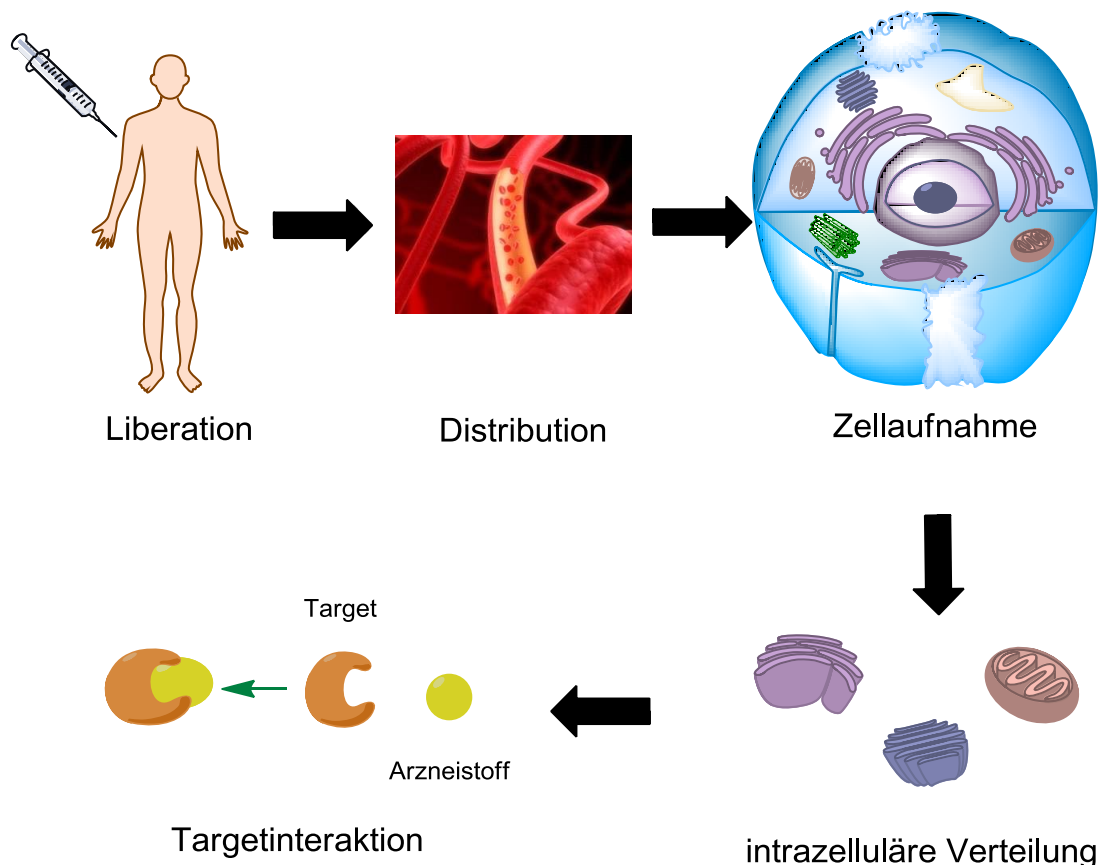


Abb. 3-4: Bioverteilung von Arzneistoffen im menschlichen Organismus

Um vom Blut in das Gewebe oder die Körperflüssigkeit zu gelangen, müssen Arzneistoffe in wässrigem Medium bei physiologischen pH-Wert löslich sein. Diese Voraussetzung stellt große Ansprüche an die Arzneistoffentwicklung, da Wirkstoffe zusätzlich möglichst lipophil sein müssen, um Zellmembranen durchdringen zu können, sofern sie nicht an spezifische Kanal- oder Transportproteine binden (siehe Kapitel 3.1). Um die Aufnahme von Arzneistoffen aus dem Blut zu erhöhen, gibt es aktuelle Forschungsarbeiten über Modifikationsmöglichkeiten am Arzneistoffmolekül. Dabei werden charakteristische Aminosäuresequenzen, sog. *cell-penetration peptides*, verwendet. [61–63]

Ein weiterer Parameter, der die Aufnahme des Arzneistoffs in die Zelle beeinflusst, ist die oben erwähnte Affinität des Wirkstoffmoleküls zu Plasmaproteinen. Nur der freie Anteil des Arzneistoffs, der nicht an Plasmaproteinen gebunden vorliegt, kann in die Zelle aufgenommen werden und ist für die Wirkung relevant. Eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen kann daher eine verminderte Wirksamkeit bedeuten. Der wichtigste Bindungspartner für Arzneistoffe ist das globuläre Protein Albumin, welches ca. 60 % der Gesamtproteine des Bluts ausmacht. (siehe Kapitel 10.2)

Nach der zellulären Aufnahme des Arzneistoffs erfolgt seine intrazelluläre Verteilung in verschiedene Zellkompartimente, bei der der Wirkstoff weitere Zellmembranen überwinden muss. Am Wirkort angekommen, kann die Interaktion mit dem Target erfolgen. Die Targetinteraktion beruht meistens auf den Wechselwirkungen funktioneller Gruppen des Wirkstoffmoleküls mit funktionellen Gruppen der Bindestelle (häufig handelt es sich dabei um funktionelle Gruppen von Aminosäuren).

## 4. Targets von metallbasierten Antitumorstoffen

Das Ziel der Tumorthherapie ist es, die Zellteilung der Tumorzellen zu hemmen und die Zelle in den programmierten Zelltod zu führen. Bekannte Targets für Antitumorstoffe, insbesondere für Metallwirkstoffe, sind die DNA. Die DNA ist im Zellkern der Zelle und zu 1 % in den Mitochondrien lokalisiert. Weitere Targets sind Enzyme, die an der DNA-Synthese bzw. –Replikation beteiligt sind, wie z.B. die Topoisomerase.

Da Tumorzellen schnell proliferierende Zellen sind, können Arzneistoffe, die den Zellzyklus beeinflussen, gezielt dessen Funktion beeinträchtigen. Ruhende Zellen werden durch die Störung der DNA-Funktion weniger beeinträchtigt. Man erhofft sich bei dieser Strategie eine Selektivität für Tumorzellen. Da der menschliche Organismus jedoch selbst schnell proliferierende Zellen wie z.B. Zellen des blutbildenden Systems und Haarzellen besitzt, ist diese Selektivität nur bedingt vorhanden. Häufig sind Nebenwirkungen wie Haarausfall und Blutbildschädigungen bei einer Therapie mit Zytostatika, die an der DNA oder der DNA-Synthese bzw. Replikation angreifen, die Folge [64]. Zu diesen Zytostatika gehören folgende Wirkstoffklassen:

- Alkylantien, z.B. Cyclophosphamid
- Platinkomplexe, z.B. Cisplatin und Analoga
- DNA-interkalierende Wirkstoffe, z.B. Anthrazykline
- Antimetabolite, z.B. 5-Fluorouracil
- Folsäure-Analoga, z.B. Methotrexat
- Topoisomerase-Inhibitoren, z.B. Etoposid

Besonders hervorzuheben sind die Platinkomplexe, da in der vorliegenden Arbeit neue Metallkomplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität mit dem Platinkomplex Cisplatin, für den die DNA als Target als bewiesen gilt, verglichen wurden.

Das in den Mitochondrien lokalisierte antioxidative Netzwerk der Zelle stellt einen interessanten Angriffsort aktueller Forschungsarbeiten für neuartige metallbasierte Antitumorstoffe dar (siehe 4.3).

## 4.1 DNA

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. *deoxyribonucleic acid*, kurz DNA) ist ein häufiges Target für Antitumorwirkstoffe, da durch den Eingriff in den DNA-Stoffwechsel der Zellzyklus gestört oder gänzlich gestoppt werden kann, was die Zelle in den gewünschten Zelltod führen kann..

### 4.1.1 Struktur der DNA

Die DNA ist der Träger der Erbinformationen. Die Struktur und der Aufbau der DNA waren jahrelang unbekannt. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts wurden von James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins und Rosalind Franklin revolutionäre Forschungsergebnisse erzielt, die im Jahre 1953 in der Fachzeitschrift *Nature* veröffentlicht wurden. [65] Einige Jahre später, im Jahre 1962, wurde ihnen, mit Ausnahme von Rosalind Franklin, die zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben war, für „ihre Entdeckungen über die Molekularstruktur der Nukleinsäuren und ihre Bedeutung für die Informationsübertragung in lebender Substanz“ der Nobelpreis der Medizin verliehen.

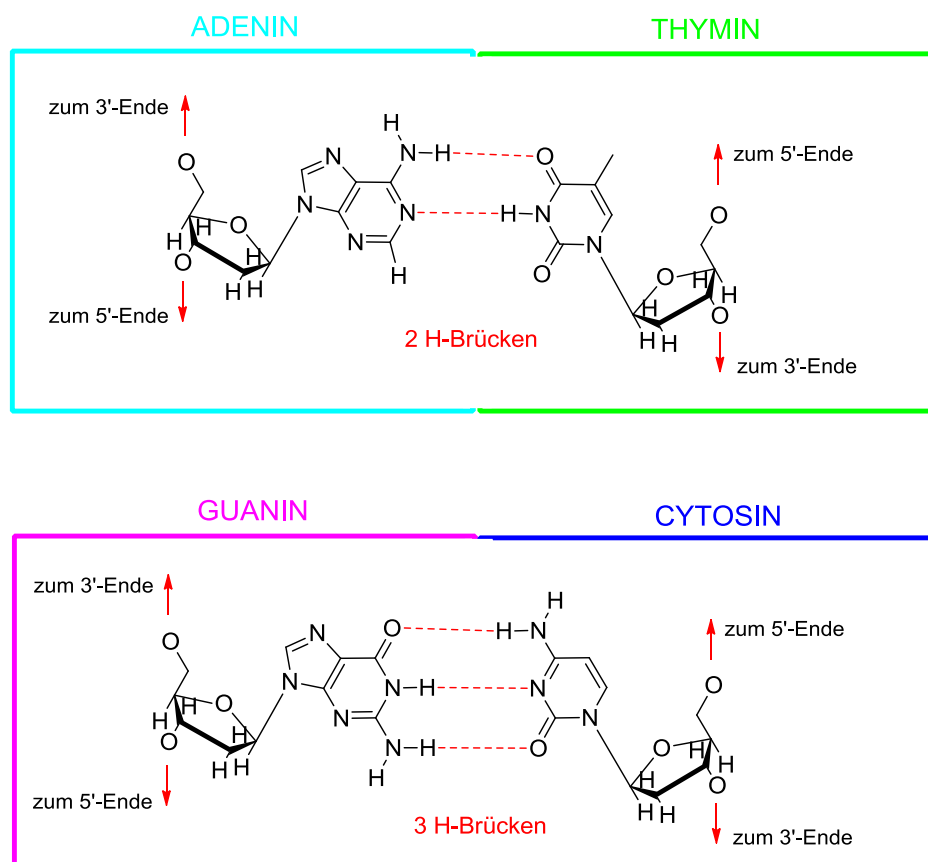
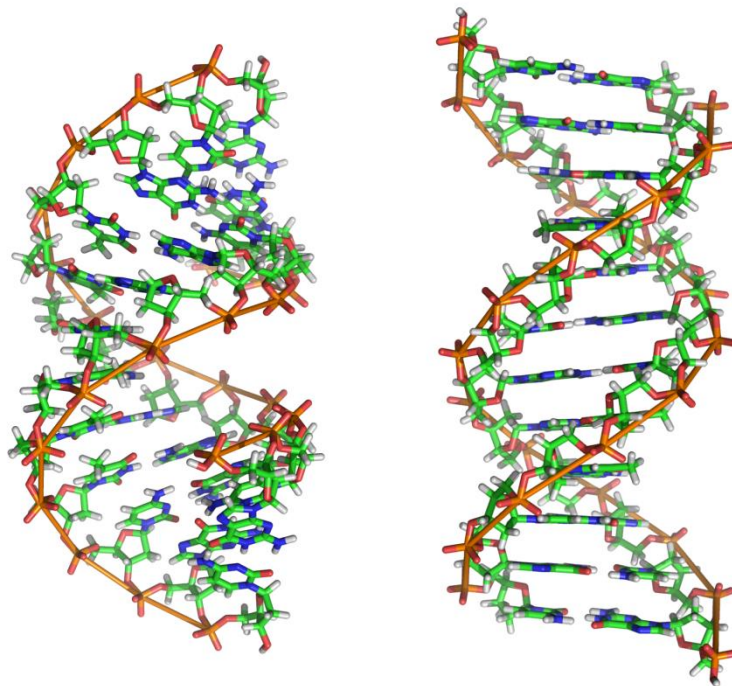


Abb. 4-1: Basenpaarung in der DNA

Sie fanden heraus, dass die Bausteine der DNA einzelne Nukleobasen sind, die miteinander über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind und Basenpaare bilden. Dabei gibt es vier verschiedene Nukleobasen, die je zwei typische Paarungen bilden: die Paarung der Nukleobasen Adenin und Thymin über zwei Wasserstoffbrücken und die Paarung von Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken (siehe Abb. 4-1). In der DNA werden die Nukleobasen als Nukleotide bezeichnet, da sie mit einem Phosphat- sowie Zuckerrest verbunden sind. Die DNA liegt physiologisch zu einem Doppelstrang hybridisiert vor. Dreidimensional wird eine Doppelhelix ausgebildet. Diese kann in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Die am häufigsten vorkommende Konformation ist die schraubenförmige Doppelhelix, die als B-DNA bezeichnet wird (siehe Abb. 4-2).



**Abb. 4-2: Strukturmodelle der A-DNA (links) und B-DNA (rechts) (nach: Zephyris, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by sa-2.0-de, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode>)**

#### **4.1.2 Wechselwirkungen von Metallkomplexen mit der DNA**

Moleküle können auf unterschiedliche Weise mit der DNA wechselwirken. Im Folgenden sind die für Metallkomplexe besonders relevanten Bindungsmodi näher beschrieben: die kovalente Bindung und Interkalation.



#### 4.1.2.1. Kovalente Bindung

Der Bindungsmodus der kovalenten Bindung wird für die auf dem Markt befindliche, in der Tumorthherapie eingesetzte Metallkomplexe Cisplatin und verwandte Platin-Komplexe angenommen. Durch die *cis*-Anordnung der Chlor-Liganden, die zuvor in den elektrophilen Aquakomplex umgewandelt werden, kann Cisplatin mit nukleophilen Funktionen von Nukleinsäuren reagieren. Die Reaktion mit allen vier Basen der DNA ist denkbar, jedoch ist das N7 des Guanins das nukleophilste Zentrum, weshalb hier bevorzugt eine Bindung stattfindet. [66]

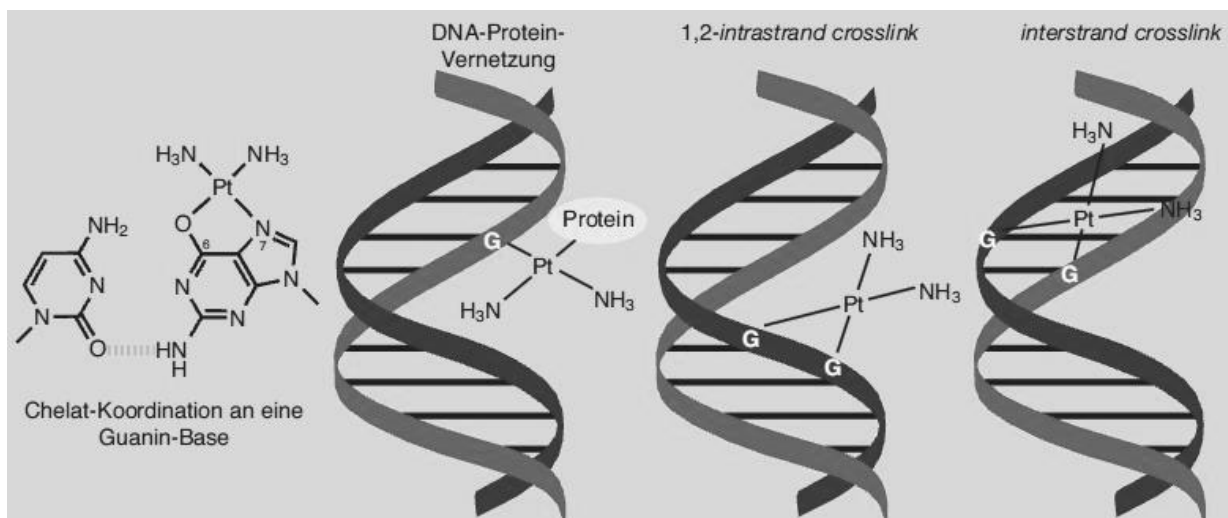


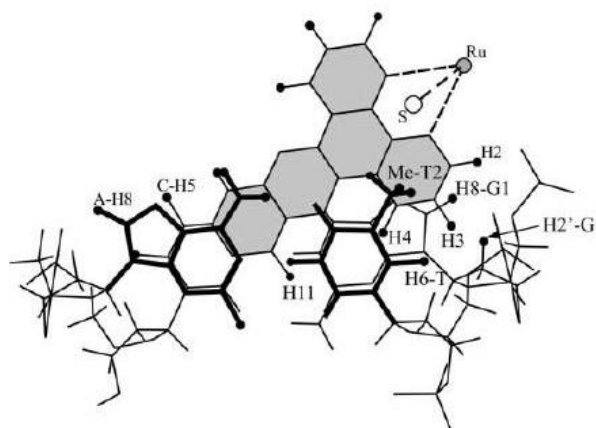
Abb. 4-3: Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin mit Guanin in doppelsträngiger DNA [6]

Es kommt dabei zunächst zu einer monofunktionalen Verbindung (DNA-Protein-Vernetzung), die dann in einer Quervernetzung („cross-linking“) innerhalb des gleichen („intrastrand-crosslink“) oder zwischen zwei verschiedenen DNA-Strängen („interstrand-crosslink“) resultiert (siehe Abb. 4-3). Die Ausbildung der intrastrand-crosslinks ist mit einer Konformationsänderung der DNA verbunden. Diese Schädigung der DNA führt letztendlich zum Zelltod, da die DNA nicht mehr abgelesen und transkribiert werden kann. [67]

Für den Titankomplex Titanocendichlorid gibt es aktuelle Bindungsexperimente, die ebenfalls von einer bevorzugten Bindung zum N7 der Nukleobase Guanin berichten. Auch eine Koordination zum Sauerstoff des Phosphats der Nukleotide wurde angenommen. [68–72]

#### 4.1.2.2. Interkalation

Interkalatoren sind aromatische Verbindungen, die aufgrund des delokalisierten Elektronensystems durch  $\pi$ -Stacking mit den Nukleobasen der DNA in Wechselwirkung treten können. Sie sind teilweise planar, so dass sich die Wirkstoffe zwischen die DNA-Basen einschieben können. Die Folge ist eine Hemmung der DNA-Replikation und Transkription. Neben den aromatischen Verbindungen sind auch Metallointerkalatoren bekannt, bei denen der interkalierende Molekülteil der Ligand des Metallatoms ist. Das Metallatom kann dabei zusätzlich durch die kationische Ladung mit der DNA in Wechselwirkung treten, wodurch man sich eine Verstärkung der Wirksamkeit erhofft. [73]



**Abb. 4-4: Schema der Interkalation von  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{AcmetOH})(\text{dppz})](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  mit der  $\text{G}_1\text{T}_2/\text{C}_6\text{A}_5$  Sequenz des Hexanukleotids  $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$  [74]**

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sheldrick hat dazu in den letzten Jahren einige Arbeiten veröffentlicht [74–76]. Ein Beispiel ist der Rutheniumkomplex  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{AcmetOH})(\text{dppz})](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ , der mit der  $\text{G}_1\text{T}_2/\text{C}_6\text{A}_5$  Sequenz des Hexanukleotids  $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$  interkalatiert (siehe Abb. 4-4).

## 4.2 Enzyme

Enzyme sind Proteine mit katalytischer Wirkung. Sie übernehmen wichtige Funktionen im menschlichen Stoffwechsel und sind an Regulationsprozessen beteiligt. Sie sind hoch spezifisch: zum einen für die Reaktion, die sie katalysieren; zum anderen für das Substrat, deren Umsetzung sie katalysieren. Viele Enzyme können auch zwischen stereoisomeren Formen des Substrats unterscheiden und setzen nur eine bestimmte Stereoform um. Die Spezifität der Enzyme lässt sich mit drei Schlagwörtern beschreiben:

- Wirkungsspezifität
- Substratspezifität
- Stereospezifität

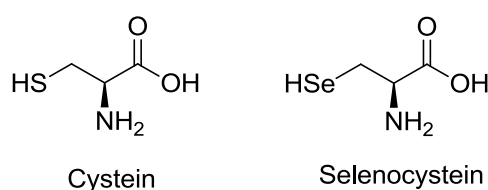
Enzyme lassen sich in sechs verschiedene Klassen einteilen. Die EC-Klassifizierung berücksichtigt die Substrat- und Wirkungsspezifität. In Tab. 4-1 sind die Hauptklassen, der katalysierte Reaktionstyp sowie die weiteren Unterklassen aufgeführt.

Tab. 4-1: Einteilung der Enzyme nach Koolman *et al.* [77]

Klasse	Reaktionstyp	Wichtige Unterklassen
<b>1 Oxidoreduktase</b>	$A_{\text{red}} + B_{\text{ox}} \rightleftharpoons A_{\text{ox}} + B_{\text{red}}$	Oxidoreduktasen, Dehydrogenasen
<b>2 Transferase</b>	$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$	Aminotransferase, Glycosyltransferase
<b>3 Hydrolase</b>	$A + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	Esterasen, Peptidasen
<b>4 Lyasen</b>	$A + B \rightleftharpoons A-B$	C-C-Lyasen, C-N-Lyasen
<b>5 Isomerasen</b>	$A \rightleftharpoons A'$	Epimerasen
<b>6 Ligasen</b>	$A + B + ATP \rightleftharpoons A-B + ADP + P_i$	C-C-Ligasen, C-O-Ligasen

Für die vorliegende Forschungsarbeit ist die Klasse der Oxidoreduktasen besonders relevant. Die Enzyme dieser Klasse katalysieren Redox-Reaktionen, bei denen sie Elektronen zwischen Redoxsystemen übertragen. Sie spielen eine große Rolle im Redoxstoffwechsel der Zelle. (siehe Kapitel 4.3) Bei den relevanten Oxidoreduktasen

des Redoxstoffwechsels der Zelle handelt es sich um Enzyme mit den Aminosäuren Cystein oder Selenocystein im aktiven Zentrum. Enzyme, die Selenocystein enthalten, werden als Selenoproteine bezeichnet. Das erste Selenoprotein, die Glutathionperoxidase, wurde im Jahr 1973 von Rotruck *et al.* entdeckt [78]. Bis zum Jahre 2003 wurden 25 eukaryontische selenocystein-haltige Enzyme identifiziert [79]. Sie zeichnen sich besonders durch ihre Redoxaktivität aus. Selenocystein ist die 21. Aminosäure und ein reaktives Analogon der Aminosäure Cystein. Beide unterscheiden sich nur durch den Austausch des Schwefelatoms gegen ein Selenatom (siehe Abb. 4-5). Dadurch erniedrigt sich der pKs-Wert von 8,0-8,5 (Cystein) auf 5,3 (Selenocystein), was eine stärker saure Eigenschaft bedeutet. Zudem ist Selenocystein durch das enthaltene Selen, welches im Periodensystem zwischen den Metallen und Nichtmetallen zu finden ist, redoxaktiver als Cystein und damit der ideale Katalysator für biologischen Redoxprozessen (siehe Kapitel 4.3). [80, 81]



**Abb. 4-5: Strukturformeln der relevanten Aminosäuren Cystein und Selenocystein**

Ein Vertreter der Selenoproteine, der als Target für neue Antitumorwirkstoffe besonders interessant ist, ist das Enzym Thioredoxinreduktase (TrxR), das erstmals 1964 aus *Escherichia coli* von Laurent *et al.* isoliert wurde [82], jedoch erst im Jahre 1996 von Tamura *et al.* als Selenoenzym identifiziert wurde [83, 84]. Es spielt eine zentrale Rolle bei der zellulärer Redoxregulation, der antioxidativen Abwehr, dem Zellwachstum sowie der Apoptose und ist deshalb ein vielversprechendes Target für die Tumorthherapie, da es in Tumorzellen überexprimiert wird. Der Goldkomplex Auranofin, das als Ridaura® gegen rheumatoide Arthritis eingesetzt wird, ist ein Inhibitor der Thioredoxinreduktase. [85] Im menschlichen Körper spielen außerdem die Enzyme Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase eine wichtige Rolle, da sie ebenfalls Produkte des oxidativen Stress abbauen. Dabei wird unter Verbrauch von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  Glutathiondisulfid zu Glutathion reduziert. Das oben erwähnte Enzym Thioredoxinreduktase funktioniert in analoger Weise. Es setzt Thioredoxindisulfid zu Thioredoxin um. (siehe Kapitel 4.3.1)

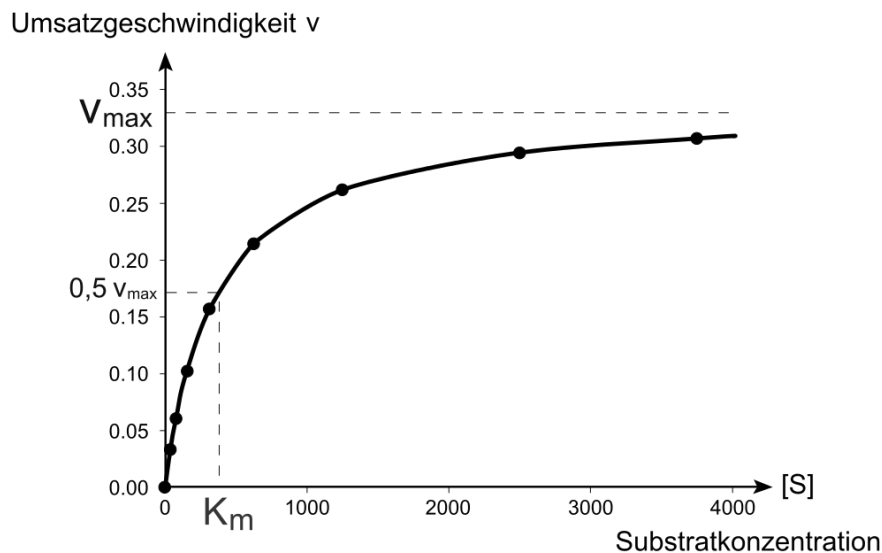
### 4.2.1 Enzymkinetik

Für die Untersuchungen an Enzymen als mögliche Targets für neue Arzneistoffe ist ein Kenntnis der Enzymkinetik unabdingbar. Dieses Wissen ist besonders wichtig, da sich die Enzymkinetik von der Kinetik klassischer chemischer Reaktionen unterscheidet. Die Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatisch katalysierten Reaktionen hängt von der Enzymkonzentration ab und die Reaktion verläuft in zwei Teilreaktionen. Die erste Teilreaktion ist die Bindung des Substrats (S) an das Enzym (E), die zweite die Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) zum Produkt (P) und Enzym.



**Formel 4-1: Reaktionsgleichung einer enzymatischen Reaktion (E: Enzym, S:Substrat, P:Substrat,  $k_{kat}$ : katalytische Konstante)**

Jede der beiden Reaktionen weist dabei eine bestimmte Geschwindigkeit auf. Da die Substratkonzentration im Vergleich zur Enzymkonzentration sehr groß ist, kann jedes Enzymmolekül mit einem Substratmolekül unter Bildung des ES-Komplexes besetzt werden. Das Enzym ist dann gesättigt. Vor dem Erreichen dieser Sättigung folgt die Reaktion einer Kinetik 1. Ordnung.



**Abb. 4-6: Verlaufskurve einer enzymatisch katalysierten Reaktion, bei der die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration  $S$  aufgetragen ist.**

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) wird erreicht, wenn die ES-Konzentration der E-Konzentration entspricht. Bei Sättigung des Enzyms mit dem

Substrat ist die Umwandlung des Substrats in das Produkt (2. Teilreaktion) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion wird als katalytische Konstante ( $k_{\text{kat}}$ ) bezeichnet. Sie gibt die Anzahl der Mole Substrat an, die unter Sättigungsbedingungen pro Mol Enzym und Sekunde in das Produkt umgewandelt werden. Sie ist auch als Wechselzahl des Enzyms bekannt und ein Maß dafür, wie gut ein Enzym eine spezifische Reaktion katalysiert.

$$k_{\text{kat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_{\text{total}}}$$

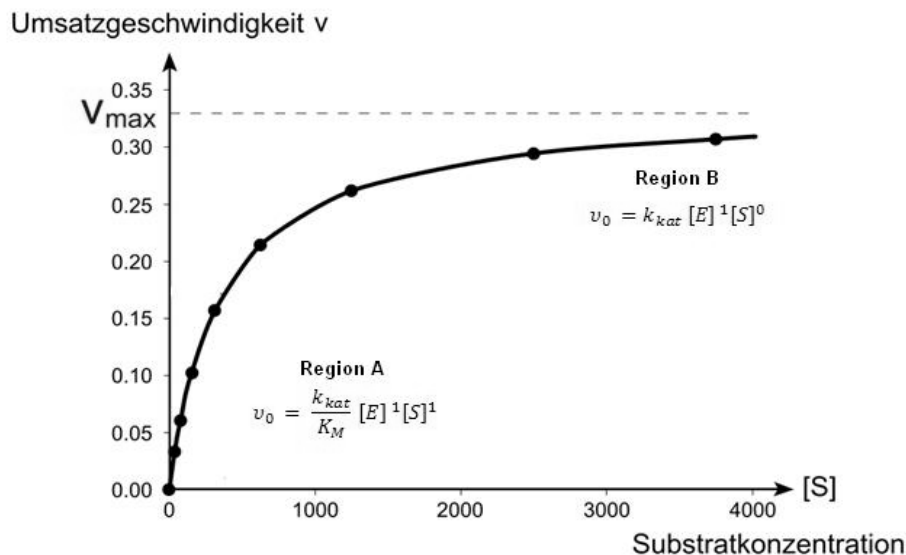
**Formel 4-2: Definition der katalytischen Konstante  $k_{\text{kat}}$  ( $V_{\text{max}}$ : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion,  $[E]_{\text{total}}$ : Gesamtenzymkonzentration)**

Die Michaelis-Menten-Theorie wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts von L. Michaelis und M. Menten zur mathematischen Beschreibung der Kinetik von enzymatischen Reaktionen aufgestellt [86, 87]. Mit Hilfe dieser Theorie ist es möglich Aktivitäten von Enzymen abzuschätzen. Der Zusammenhang der Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion und der Substratkonzentration ist mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben.

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_M + [S]}$$

**Formel 4-3: Zusammenhang der Anfangsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion mit der Substratkonzentration beschrieben als sog. Michaelis-Menten-Gleichung ( $V_{\text{max}}$ : Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion,  $K_M$ : Michaelis-Konstante,  $[S]$ : Substratkonzentration)**

Die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) ist dabei die Substratkonzentration, bei der die Anfangskonzentration die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) ist (siehe Abb. 4-6). Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Je kleiner  $K_M$  ist, desto höher ist die Affinität.



**Abb. 4-7: Bedeutung der katalytischen Konstante  $k_{\text{kat}}$  und des Quotienten  $k_{\text{kat}}/K_M$  nach Biele *et al.* [57]**

Mit Hilfe der beiden vorgestellten kinetischen Konstanten  $k_{\text{kat}}$  und  $K_M$  lassen sich die Aktivität von Enzymen und die katalytische Effizienz abschätzen. Der Quotient aus  $k_{\text{kat}}$  und  $K_M$  ( $k_{\text{kat}}/K_M$ ) wird häufig verwendet um die Aktivitäten von verschiedenen Enzymen zu vergleichen. In Abb. 4-7 ist die Bedeutung der katalytischen Konstante  $k_{\text{kat}}$  und der Michaelis-Konstante  $K_M$  in der Michaelis-Menten-Kurve graphisch veranschaulicht.  $K_{\text{kat}}$  entspricht der Geschwindigkeitskonstanten der 2. Teilreaktion, der Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes zum Produkt und Enzym, und kann bei Substratsättigung bestimmt werden (Region B in Abb. 4-7). Die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion (Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und dessen Umsetzung) kann mithilfe des Quotienten  $k_{\text{kat}}/K_M$  bei geringen Substratkonzentrationen (Region A in Abb. 4-7) definiert werden. Die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms ergibt sich aus dem Quotienten  $k_{\text{kat}}/K_M$  dividiert durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_n$  derselben Reaktion in Abwesenheit des Enzyms.

$$\text{katalytische Wirksamkeit} = \frac{\frac{k_{\text{kat}}}{K_M}}{k_n}$$

**Formel 4-4: Katalytische Wirksamkeit von Enzymen ( $k_{\text{kat}}$ : katalytische Konstante,  $K_M$ : Michaelis-Konstante,  $k_n$ : Geschwindigkeitskonstante der Reaktion)**

Da nicht enzymatisch katalysierte Reaktionen nur sehr langsam ablaufen, lässt sich  $k_n$  nur schwer bestimmen und es sind nur für wenige Enzyme Werte über die katalytische Wirksamkeit in der Literatur zu finden.

#### **4.2.2 Hemmung der Enzymaktivität**

Bei der Arzneistoffentwicklung ist es häufig das Ziel, Arzneistoffe zu entwickeln, die spezifisch an ein bestimmtes Enzym binden. Forscher versuchen Moleküle so zu designen, dass es perfekt in die Bindetasche (oder andere regulatorische Zentren des Enzyms) passt. Das Vorbild ist häufig das physiologische Substrat des abgezielten Enzyms. Da es sich jedoch nicht um das richtige Substrat handelt, kommt es nicht zu einer Umsetzung des Substrats zum Produkt. Das Enzym wird blockiert oder in seiner Aktivität gehemmt. Diese Hemmung führt dazu, dass das Enzym seine Rolle in der Regulation des Stoffwechsels nicht mehr ausüben kann. Der größte Teil der Arzneistoffe wirkt auf diese Art und Weise. Deshalb sind enzymatische Experimente wichtig für die Arzneistoffforschung. In der Antitumorthherapie erhofft man sich durch die gezielte Hemmung von Enzymen in Tumorzellen, dass der Stoffwechsel zum Erliegen kommt und die Zelle sich in den programmierten Zelltod begibt.

Durch die Bindung eines Arzneistoffs, der hier als Hemmstoff (Inhibitor) fungiert, an das Enzym kann die enzymatische Reaktion reversibel oder irreversibel gehemmt werden. Die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion wird durch den Inhibitor, der an unterschiedlichen Stellen des Enzyms binden kann, in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Zusätzlich gibt es chemische und physikalische Einflüsse, die das Enzym in unspezifischer Weise beeinträchtigen können.

##### **4.2.2.1. Reversible Hemmung**

Reversible Inhibitoren binden über nicht kovalente Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbindung und Van-der-Waals-Kräfte, an das Enzym und hinterlassen keine strukturellen Veränderungen am Enzym.

Es sind drei verschiedene Hemmtypen zu unterscheiden (siehe Abb. 4-8):

- die kompetitive Hemmung,
- die nicht kompetitive Hemmung
- und die unkompetitive Hemmung.



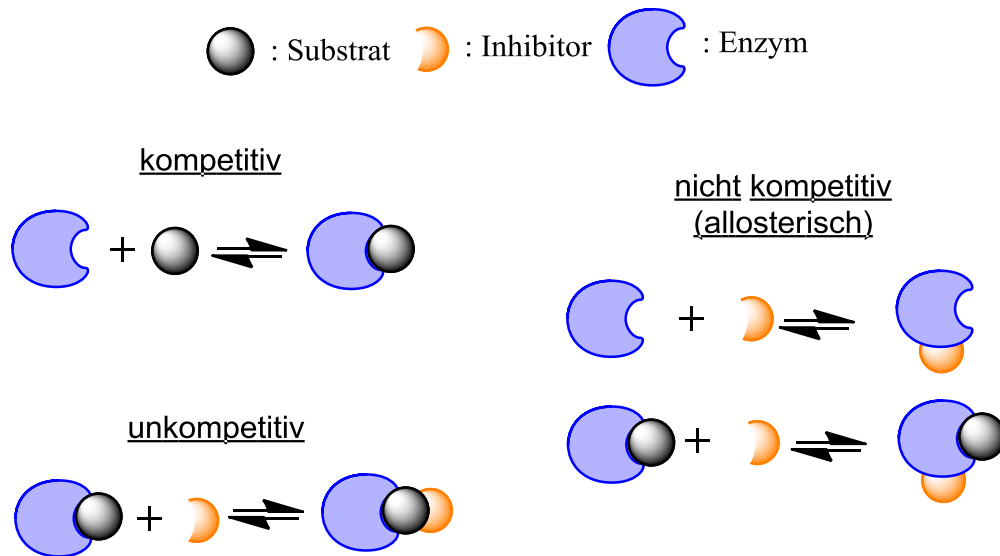
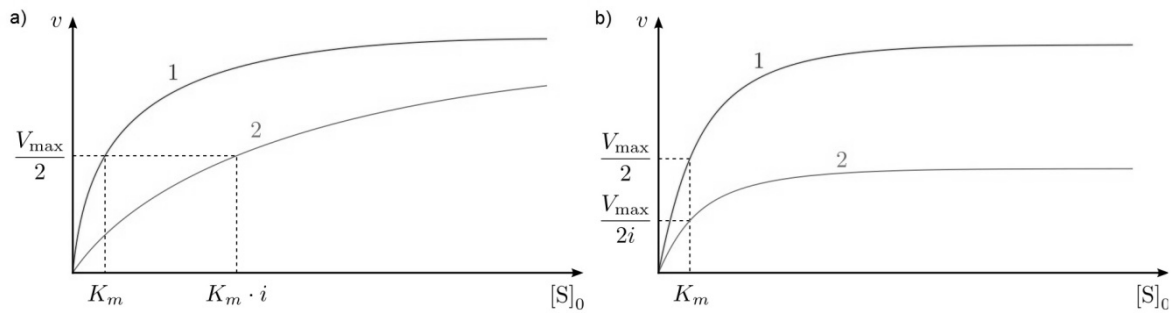


Abb. 4-8: Verschiedene Formen der reversiblen Enzymhemmung

### Kompetitive Hemmung

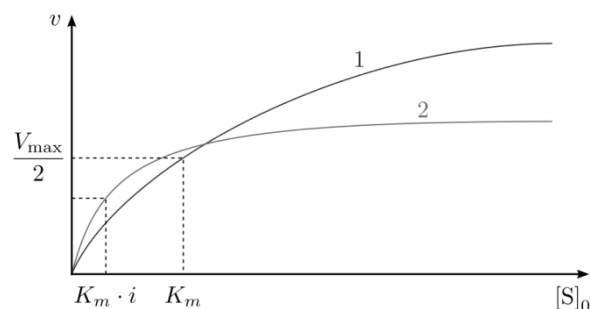
Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren der Inhibitor und das physiologische Substrat um die Bindung an das Enzym. Inhibitor und Substrat sind sich strukturell sehr ähnlich. Im Gegensatz zum physiologischen Substrat kann der Inhibitor jedoch nicht vom Enzym zum Produkt umgesetzt werden. Durch die Bindung des Inhibitors wird die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion herabgesetzt, da eine gewisse Enzymmenge durch den Inhibitor blockiert wird und nicht für die Umsetzung des Substrats zur Verfügung steht. In Bezug auf die Enzymkinetik bedeutet das, dass die Michaelis-Konstante  $K_M$  steigt, da die halbmaximale Geschwindigkeit ( $1/2 V_{max}$ ) erst später erreicht wird (siehe Abb. 4-9 a). Die Maximalgeschwindigkeit selbst wird durch einen kompetitiven Inhibitor jedoch nicht beeinflusst, da bei hohen Substratkonzentrationen die Konkurrenzsituation positiv auf Seiten der Substratumsetzung liegt.



**Abb. 4-9: Michaelis-Menten-Kinetik einer kompetitiven Hemmung (a) und nicht kompetitiven Hemmung (b) mit (1) und ohne (2) Inhibitor [Wikipedia Commons, files: „Michaelis-Menten\_plot\_competitive\_inhibition.svg“ und „Michaelis-Menten\_plot\_non-competitive\_inhibition.svg“ ]**

### Nicht kompetitive Hemmung

Ein nicht kompetitiver Inhibitor bindet im Gegensatz zum kompetitiven Inhibitor nicht in der Substratbindetasche an das Enzym sondern an einer anderen funktionellen Stelle. Diese Art der Hemmung wird auch als allosterische Hemmung bezeichnet, wenn der Inhibitor an das allosterische Zentrum des Enzyms bindet. Durch die Bindung kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Enzyms, die die Bindung des Substrats erschwert, aber dennoch ermöglicht. Das Substrat kann weiter umgesetzt werden, jedoch mit einer geringeren Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  (siehe Abb. 4-9 b). Die Abnahme der Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  geht auch mit einer Abnahme der katalytischen Konstante  $k_{\text{kat}}$  einher. Die Michaelis-Konstante  $K_M$  bleibt hingegen gleich.



**Abb. 4-10: Michaelis-Menten-Kinetik einer unkompetitiven Hemmung mit (1) und ohne (2) Inhibitor [Wikipedia Commons, file: „Michaelis-Menten\_plot\_uncompetitive\_inhibition.svg“]**

## Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung handelt es sich um einen aus der kompetitiven und nicht kompetitiven Hemmung gemischten Fall, da sowohl die Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  als auch die Michaelis-Konstante  $K_M$  beeinflusst werden (siehe Abb. 4-10). Möglich ist das durch Bindung eines Inhibitors an den Enzym-Substrat-Komplex, so dass dieser nicht weiter zu Produkt und Enzym umgesetzt werden kann.

### 4.2.2.2. Irreversible Hemmung

Irreversible Hemmstoffe binden kovalent an das Enzym und hinterlassen eine irreversible Modifizierung des Enzyms. Die katalytische Wirksamkeit des Enzyms wird dadurch bleibend verändert und hängt von der Konzentration des Inhibitors ab. Ist die Inhibitorkonzentration wesentlich größer als die Enzymkonzentration, so handelt es sich bei der ablaufenden Reaktion um eine Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung.

### 4.2.2.3. Unspezifische Hemmung

Unspezifisch können Enzyme durch chemische und physikalische Einflüsse gehemmt werden. Bei der Durchführung von enzymatischen Experimenten und der Angabe von katalytischen Enzymaktivitäten müssen daher diese Parameter aus Gründen der Vergleichbarkeit genau beachtet werden. Zu diesen Größen zählen der pH-Wert, die Temperatur und Metalle:

- **pH-Wert:** Jedes Enzym besitzt ein pH-Optimum, bei dem die Aktivität maximal ist.
- **Temperatur:** Die Aktivität von Enzymen erhöht sich in der Regel mit steigender Temperatur. Ab einer bestimmten Temperatur, die häufig  $\geq 40\text{ °C}$  liegt, kommt es jedoch zu einer Denaturierung des Enzyms, wodurch die Struktur des Enzyms zerstört wird und es zum vollständigen Aktivitätsverlust kommt.
- **Metalle:** Metalle, wie Eisen ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ), Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) oder Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ ), fungieren als Cofaktoren von Enzymen. Dabei stabilisieren sie die Struktur von Enzymen oder beteiligen sich an Redoxreaktionen.

#### 4.2.2.4. Hemmkinetik

Zur besseren Veranschaulichung der Hemmkinetik von Enzym hat sich das Lineweaver-Burk-Diagramm bewährt. Dabei handelt es sich um ein Linearisierungsverfahren zur besseren grafischen Darstellung der kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$ , bei der die reziproke Geschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen wird. (siehe Abb. 4-11) Nach Linearisierung ist der Schnittpunkt mit der y-Achse die reziproke Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max}$  und der Schnittpunkt mit der x-Achse die reziproke Michaelis-Konstante  $K_M$ . [88]

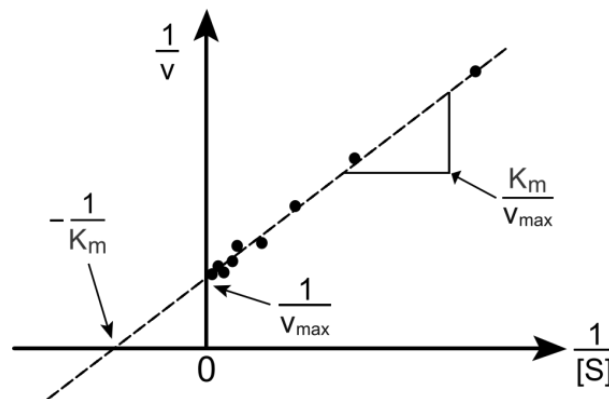


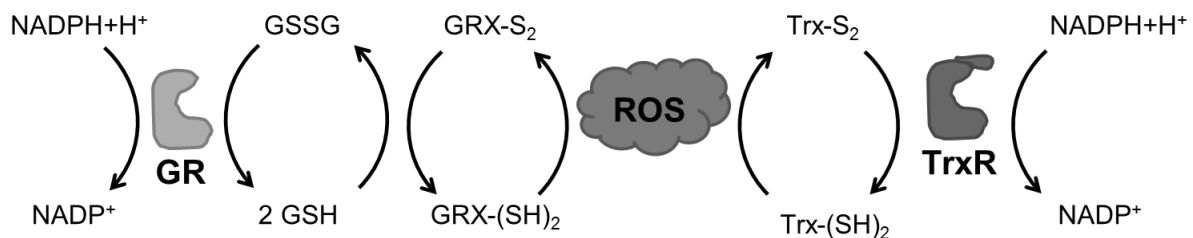
Abb. 4-11: Lineweaver-Burk-Diagramm, doppelt-reziproke Darstellung, bei der  $1/v$  über  $1/[S]$  aufgetragen wird [Pro bug catcher, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0-de, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode>]

### 4.3 Zellulärer Redoxstoffwechsel

Redoxreaktionen liefern durch Übertragung von Elektronen, u.a. in biochemischen Reaktionen des Citratzyklus und der Atmungskette, die für die Zellen benötigte Energie. Das Zellorganell mit der höchsten Redoxaktivität sind die Mitochondrien [89]. Von besonderer Bedeutung sind dabei die von Oxidoreduktasen (siehe Kapitel 4.2) katalysierten Reaktionen, da während des zellulären Metabolismus freie Sauerstoffradikale, sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), entstehen, die zur Vermeidung von oxidativem Stress und damit verbundenen Zellschäden, die im programmierten Zelltod enden können, inaktiviert werden müssen. Diese Inaktivierung und Aufrechterhaltung des reduzierten Milieus in der Zelle wird durch die Oxidoreduktasen Thioredoxinreduktase (TrxR) und Glutathionreduktase (GR) mittels reversiblen Thiol-Disulfid-Reaktionen unter Energieverbrauch in Form von  $NADPH+H^+$  gewährleistet [81, 90] (siehe Abb. 4-12). Die redoxaktiven Aminosäuren Cystein bzw. Selenocystein in den

Enzymen TrxR und GR werden durch einen Elektronen-Transfer in Kombination mit einem Hydridtransfer über die Coenzyme  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  reduziert [91]. Weitere relevante Enzyme im oxidativen Netzwerk der Zelle sind die Glutathionperoxidase (GPx), Glutathion-S-transferase (GST) und Glutaredoxinreduktase (GTR), auf die im Folgenden nicht näher eingegangen wird, da sie für die vorliegende Forschungsarbeit nicht relevant sind.

In der Bekämpfung von Tumorerkrankungen ist das antioxidative Netzwerk der Zelle ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Antitumorwirkstoffe, da Tumorzellen eine 10-fach höhere Konzentration an ROS aufweisen als gesunde Zellen, eine höhere metabolische Aktivität besitzen und einen Sauerstoffmangel haben. [92, 93]



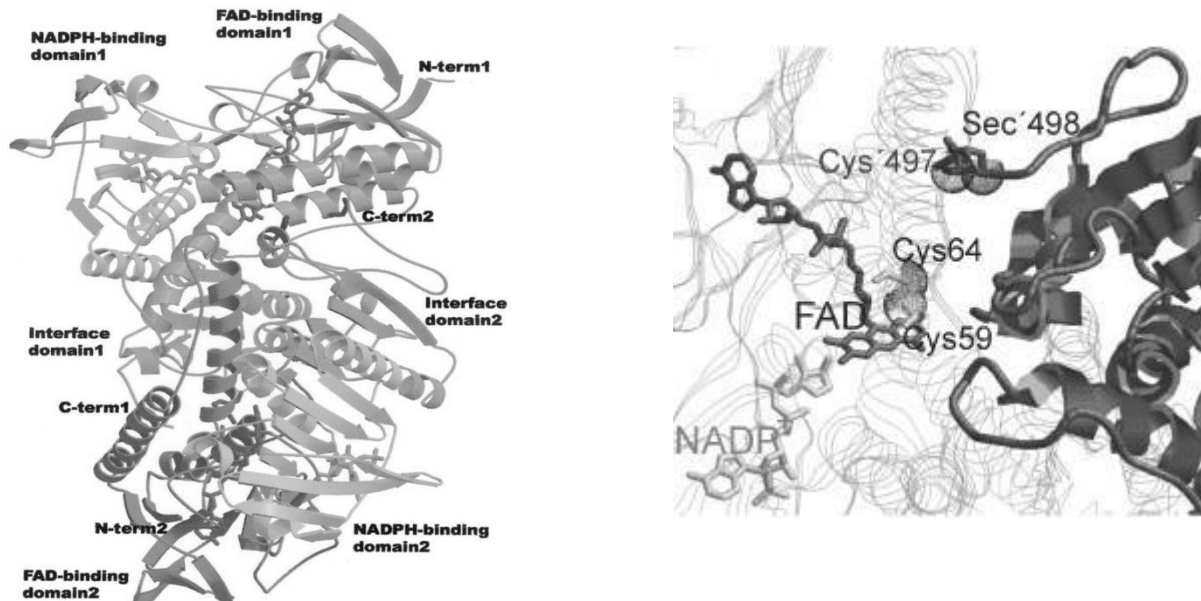
**Abb. 4-12: Das Glutathion- und Thioredoxin-System nach Holmgren [94] (Erläuterungen zu den Abkürzungen siehe Text)**

#### 4.3.1 Glutathion- und Thioredoxin-System

Bei dem Glutathion- und Thioredoxin-System handelt es sich um thiolabhängige Redoxsysteme, die essentiell sind, um den Redoxstatus der Zelle zu regulieren. Daneben spielt es eine Rolle für das Zellwachstum, die antioxidative Abwehr und die Apoptose.

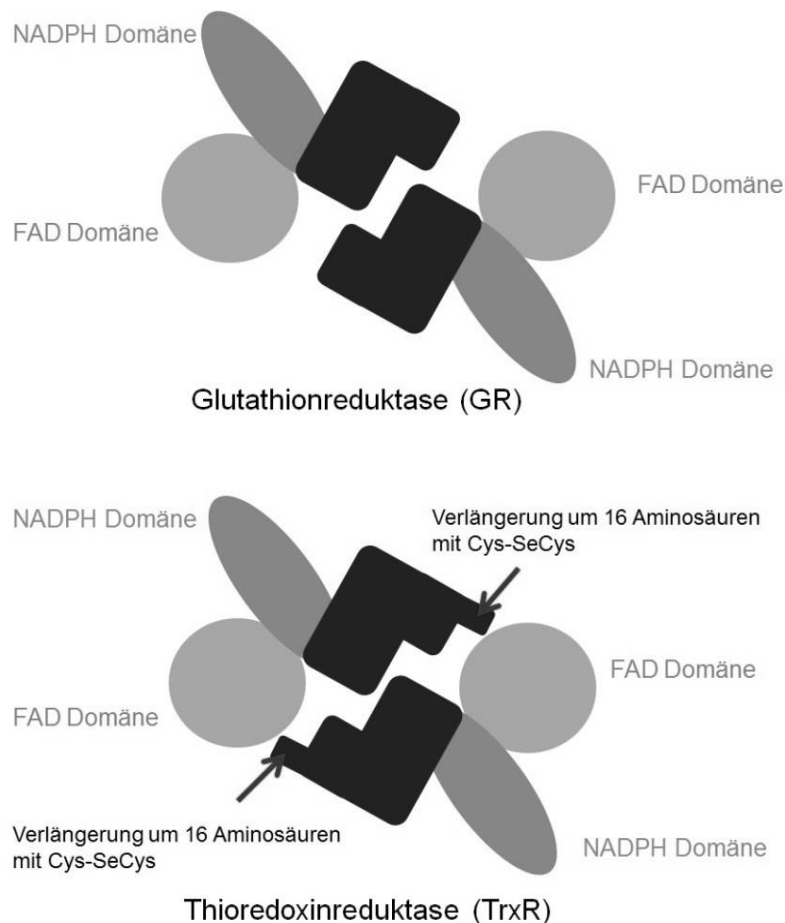
Die TrxR katalysiert die Reduktion von Thioredoxin (Trx) unter Verbrauch von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . Trx ist ein für den Menschen essentielles Protein, das an vielen zellulären Stoffwechselprozessen wie Zellwachstum, Inaktivierung von ROS und Apoptose der Zelle beteiligt ist. [95, 96] Bei dem Schutz der Zelle vor ROS wird Trx von seiner reduzierten Form  $\text{Trx-(SH)}_2$  in die Form oxidierte Form  $\text{Trx-S}_2$  oxidiert. Die freie Thiol-Gruppe der reduzierten Form überträgt dabei Elektronen auf die ROS und macht diese unschädlich. (siehe Abb. 4-12) Formal handelt es sich dabei um eine nukleophile Substitution eines Thiols, die zur Oxidation des Nukleophils und Reduktion der Abgangsgruppe führt. Durch anschließende Reduktion des entstandenen Disulfids

durch das Enzym TrxR wird die reduzierte Form der Trx wieder regeneriert und steht für die Inaktivierung weiterer ROS zur Verfügung.



**Abb. 4-13: Ribbon-Darstellung der TrxR [97] (links), Katalytisches Zentrum der TrxR [98] (rechts)**

Neben der eukaryontischen TrxR ( $M_{w(\text{Monomer})} \geq 55$  kDa) gibt es noch die kleinere, prokaryontische TrxR ( $M_{w(\text{Monomer})} \sim 35$  kDa), die sich neben ihrer Größe auch in der Substratspezifität unterscheidet. [99, 100] Die eukaryontische TrxR ist ein Dimer mit jeweils einer NADPH- und einer FAD-Bindestelle und besitzt zwei katalytische Zentren (siehe Abb. 4-13 links). Am C-Terminus der katalytischen Zentren befindet sich ein Selenocystein-haltiger Rest mit der Sequenz Gly-Cys-SeCys-Gly (siehe Abb. 4-13 rechts). [97, 101] Das Selenocystein ist essentiell für die Funktionalität des Enzyms, wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde. [102, 103] Im menschlichen Organismus kommen drei verschiedene Formen der TrxR vor. Bei der TrxR 1 handelt es sich um die cytosolische TrxR, die eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellhomöostase durch Regeneration von Trx und Inaktivierung von ROS spielt. Die TrxR 2 ist die mitochondriale TrxR, die u.a. für das Einleiten der Apoptose relevant ist. [95, 104] Von der TrxR 3 ist die Funktion bisher unbekannt [105].



**Abb. 4-14: Homologiemodell der GR und TrxR nach Zhong *et al.* [97]**

Die GR, dessen Substrat das Glutathion (GSH) ist, ähnelt der TrxR strukturell sehr [106]. In Abb. 4-14 ist ein Homologiemodell der GR und TrxR dargestellt. Im Gegensatz zur TrxR enthält die GR eine um 16 Aminosäuren verkürzte Sequenz im katalytischen Zentrum, die keinen Selenocystein-Baustein enthält. [107, 108] Dieser Austausch bewirkt neben anderen Redox-Eigenschaften (siehe Kapitel 4.2) auch eine größere Selektivität des aktiven Zentrums des Enzyms für die Substrate, was man sich in der Arzneistoffentwicklung zu Nutzen macht (siehe 4.3.3). [109] Die Inaktivierung der ROS durch das Glutathion-System läuft über ein weiteres kleines Redoxenzym, das Glutaredoxin (GRX). GRX-SH<sub>2</sub> überträgt die Elektronen der Thiol-Gruppe auf die ROS während GSH von seiner oxidierten monomeren Form in das Dimer GSSG übergeht. Mithilfe der GR wird GSH unter Verbrauch von NADPH+H<sup>+</sup> regeneriert. (siehe Abb. 4-12)

### 4.3.2 Antitumoraktive Thioredoxininhibitoren

Wie unter 4.3 erwähnt ist das antioxidative Netzwerk der Zelle ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Antitumorwirkstoffe, da Tumorzellen eine hohe Konzentration an ROS aufweisen. Zusätzlich ist das Enzym Thioredoxinreduktase in Tumorzellen überexprimiert ist, was es zu einem interessanten Target für neuartige Wirkstoffe in der Tumorthherapie macht. [103, 110, 111]

Obwohl einige Einträge über TrxR-Inhibitoren in den wissenschaftlichen Datenbanken zu finden sind, gibt es nur wenige direkte und selektive TrxR-Inhibitoren. Die Ursache dafür ist, dass einige Inhibitoren fälschlicherweise als Substrate der TrxR identifiziert worden sind, da diese nicht direkt über die  $K_M$ -Erhöhung oder den  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -Verbrauch bestimmt wurden. [109, 112] Das Konzept der selektiven TrxR-Hemmung ist daher relativ neu. In Tab. 4-2 sind einige relevante zugelassene Arzneistoffe oder Arzneistoffe in klinischer Prüfung, für die eine TrxR-Inhibition belegt ist, sowie ihre Indikationen gelistet.

Tab. 4-2: TrxR-Inhibitoren

Arzneistoff	Arzneistoffklasse	Indikation	Quelle
<b>Cisplatin</b>	Platinverbindung	Tumor	[113, 114]
<b>Auranofin</b>	Goldverbindung	Arthritis	[114–117]
<b>ATO</b>	Arsenverbindung	Leukämie	[118, 119]
<b>MGd</b>	Gardoloniumverbindung	Krebs (in klin. Prüfung)	[120, 121]
<b>DNCB</b>	Aromatische Nitroverbindung	Melanom	[122, 123]

### Platinverbindungen

Platinverbindungen wie Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin sind bekannte Antitumorwirkstoffe mit breitem klinischem Einsatz (siehe Kapitel 1). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Bildung von irreversiblen DNA-Platin-Addukten, die zu DNA-Schäden und damit verbundenen Störungen des Zellzyklus führen, den Zelltod der Tumorzellen verursachen, der Wirkungsmechanismus der Platinkomplexe ist [66]. In



den letzten Jahren konnten einige Studien zeigen, dass Platinkomplexe auch andere Biomoleküle und Stoffwechselwege beeinflussen [114, 124, 125]. So ist Cisplatin als Elektrophil, das bevorzugt mit Nukleophilen wie Thiolen oder Selenolen reagiert, unter reduzierenden Bedingungen auch ein TrxR-Inhibitor. Sasada *et al.* [125] konnten sogar eine dosisabhängige Reduktion der TrxR-Enzymaktivität und Zellviabilität beobachten. Es wurden von Witte *et al.* auch Studien zur GR-Inhibition durchgeführt. Interessanterweise konnte auf dieses Enzym, welches sich im Gegensatz zur TrxR kein Selenocystein enthält, kein Aktivitätsverlust nach Inkubation mit Cisplatin festgestellt werden, deshalb wird vermutet, dass der Selenocystein-Rest ein weiteres Target von Platinkomplexen sein könnte. [126]

### **Goldverbindungen**

Goldverbindungen werden klinisch für die Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Jahrelang war der Wirkmechanismus dieser Verbindungen unklar. Doch mit zunehmenden Interessen an der Forschung auf dem Gebiet neuer Gold(I) und Gold(III)-Komplexe, wurden auch mehr Studien zur Targetidentifizierung dieser Verbindungen veröffentlicht. Da Gold eine hohe Affinität zu Thiolen aufweist [114], kam die TrxR als mögliches Target in Betracht, was sich in zahlreichen Studien bestätigte [50–55]. Im Vergleich zu den Platinverbindungen liegt die  $IC_{50}$ -Konzentration (halbmaximale Inhibition der enzymatischen Aktivität) der Goldkomplexe im nanomolaren Bereich. Gromer *et al.* bestimmten für Auranofin® einen  $IC_{50}$ -Wert (TrxR) von 20 nM, für die GR beobachteten sie einen um den Faktor 2000 verminderten  $IC_{50}$ -Wert ( $IC_{50}(GR) = 40 \mu M$ ). Neuartige Gold(I)-Komplexe, wie die von Meyer *et al.* synthetisierten Gold-Alkynyl-Komplexe, zeigen ebenfalls eine selektive TrxR-Hemmung und  $IC_{50}$ -Werten im nanomolaren Bereich [53].

### **Arsenverbindungen**

Arsentrioxid wird zur Behandlung von speziellen Leukämie-Formen eingesetzt [127]. Über den Wirkmechanismus dieses Arzneistoffs ist nur wenig bekannt, es wird jedoch ebenfalls eine TrxR-Hemmung vermutet, da Lu *et al.* zeigen konnte, dass Arsentrioxid TrxR im submikromolaren Bereich ( $IC_{50} = 0,25 \mu M$ ) hemmt [99, 119].

### **Gardoloniumverbindungen**

Die Gardoloniumverbindung MGd wird in der Krebstherapie eingesetzt [121]. Has-hemy *et al.* [120] konnten zeigen, dass die TrxR, speziell die zytosolische TrxR1, durch den Gardoloniumkomplex inhibiert wird ( $IC_{50} = 6 \mu M$ ).

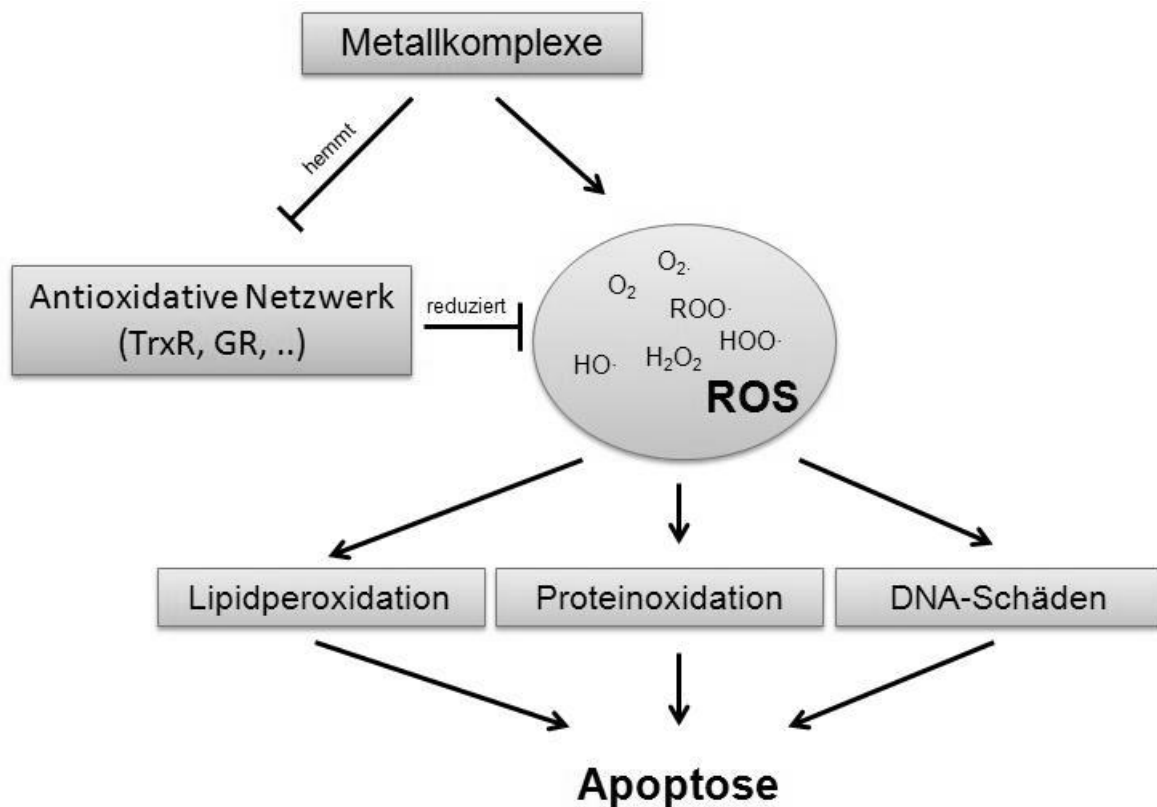
### **Aromatische Nitroverbindungen**

Für die aromatische Nitroverbindungen, die zur Behandlung von Melanomen eingesetzt werden, wurde eine Hemmung der TrxR am Selenocystein- und Cystein-Rest beobachtet [122].

#### **4.3.3 Eingriffsmöglichkeiten von Metallkomplexen in das Antioxidative Netzwerk der Zelle**

Auffallend ist, dass es sich bei den unter 4.3.2 vorgestellten TrxR-Inhibitoren größtenteils um Metallverbindungen handelt. Metallwirkstoffe besitzen ein hohes Potential Redoxreaktionen einzugehen, da Übergangsmetalle mehrere Oxidationsstufen annehmen können. Als Beispiel sei hier das Platin erwähnt, das in den Oxidationsstufen +2 und +4 vorkommen kann. Nach dem HSAB (engl. *hard and soft acids and bases*)-Konzept [128] ist Pt(II) eine weiche Säure, wohingegen Pt(IV) eine harte Säure ist. Das Konzept basiert auf dem Lewis-Säure-Base-Konzept und besagt, dass weiche Säuren leicht mit weichen Basen wie schwefelhaltigen (z.B. GSH) oder cysteinreichen (z.B. TrxR) Molekülen reagieren. Harte Säuren besitzen dagegen eine höhere Ladungsdichte und reagieren daher bevorzugt mit harten Basen. Aufgrund dieser Eigenschaft von Metallen können metallbasierte Wirkstoffe in den Redoxstoffwechsel der Zelle eingreifen, da sie in der Lage sind mit den relevanten Enzymen zu interagieren.

Ein weiteres Konzept, dass bei Metallwirkstoffen eine Rolle spielt, ist das *activation by reduction* (dt. Aktivierung durch Reduktion)-Konzept. Es besagt, dass weniger aktive Metallverbindungen als Prodrugs erst in der Tumorzelle durch Reduktion aktiviert werden. Eine gezielte Entfaltung der Wirkung direkt in der Tumorzelle wäre bei diesem Konzept denkbar, wenn die Aktivierung erst im Tumorgewebe erfolgt. Choi *et al.* [129] konnten für Platin(IV)-Komplexe einen Wirkmechanismus nach diesem Konzept beobachten.



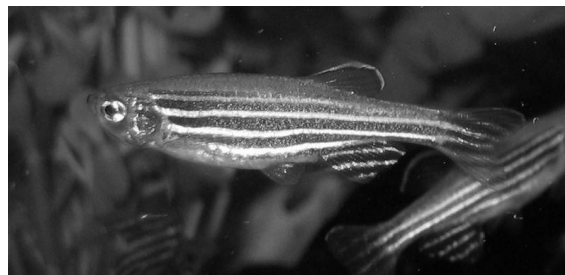
**Abb. 4-15: Eingriffsmöglichkeiten von Metallwirkstoffen in den zellulären Redoxstoffwechsel**

Für Metallkomplexe als Antitumorwirkstoffe sind zwei Angriffsorte im Redoxstoffwechsel der Zelle denkbar. Zum einen können Metallwirkstoffe, aufgrund ihres Potentials Redoxreaktionen einzugehen, die Konzentration an freien Sauerstoffradikalen in Tumorzellen erhöhen. Zum anderen können sie nach dem HSAB-Konzept mit Enzymen des antioxidativen Netzwerkes (z. B. TrxR, GR) reagieren und diese möglicherweise hemmen (siehe Abb. 4-15). Beide Wirkmechanismen führen zu einer höheren ROS-Konzentration in der Tumorzelle, was diese in letzter Konsequenz zum gewünschten Zelltod führt [130, 131].

Durch die per se höheren Konzentrationen an ROS in Tumorzellen und die höhere Konzentration des Enzyms TrxR ist eine selektive Wirkung für Tumorzellen denkbar. Von dieser selektiven Wirkung verspricht man sich weniger Nebenwirkungen.

## 5. Der Zebrafisch als Modellorganismus für die präklinische Arzneistoffentwicklung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*, Abb. 5-1), häufig als Zebrafisch (engl. *zebrafish*) bezeichnet, hat sich in den letzten Jahren zu einem vielseitigen Modellsystem in der Grundlagenforschung entwickelt [132, 133]. Natürlicherweise lebt der ca. 4,5 cm große adulte Fisch in den tropischen Gewässern Indiens und Südafrikas.



**Abb. 5-1:** Ausgewachsener, genetisch unveränderter Zebrafisch [*Wikipedia Commons*, file: „zebrafish.jpg“]

Bis zum Jahr 1999 gab es lediglich 2000 Publikationen über den Zebrafisch, seit 2009 sind es weit über 12.000 Veröffentlichungen, was die Relevanz dieses Modellorganismus für die heutige Forschung nicht nur in der Entwicklungsbiologie, sondern auch in der Pharmakologie und Medizin, verdeutlicht. Der Zebrafisch bietet im Vergleich zur Maus bzw. Knockout-Maus, welche seit Jahren „das“ Versuchstier in den Forschungslaboratorien ist, einige Vorteile, was dessen Beliebtheit und Einsatz in der Arzneistoffforschung und –entwicklung, z.B. für das toxikologische Screening biologisch wirksamer Substanzen, erklärt. [132, 134–137]

### 5.1 Entwicklungsbiologie des Zebrafischs

Der Zebrafisch ist ein wichtiger Modellorganismus in der biologischen, medizinischen und pharmakologischen Forschung. Die Hauptgründe dafür liegen in

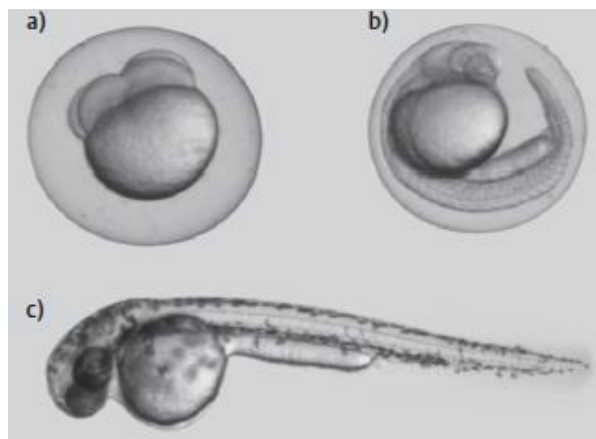
- der einfachen Haltung des Zebrafisches mit geringem Platzbedarf (siehe Abb. 5-2),
- der hohen Nachkommenzahl,

- der sehr schnellen, transparenten und extramateralen Embryonalentwicklung sowie
- der einfachen genetischen Manipulierbarkeit.



**Abb. 5-2: Zebrafischlaboratorien des Zoologischen Instituts der TU Braunschweig**

Die größten Vorteile des Zebrafisches gegenüber anderen Modellorganismen sind die hohe Nachkommenzahl und der geringe Platzbedarf der Aquarien (siehe Abb. 5-2). Ein Zebrafischweibchen kann alle 1-2 Tage mehrere Hundert Eier legen, was einer kurzen Generationszeit von etwa drei Monaten entspricht. [138, 139]



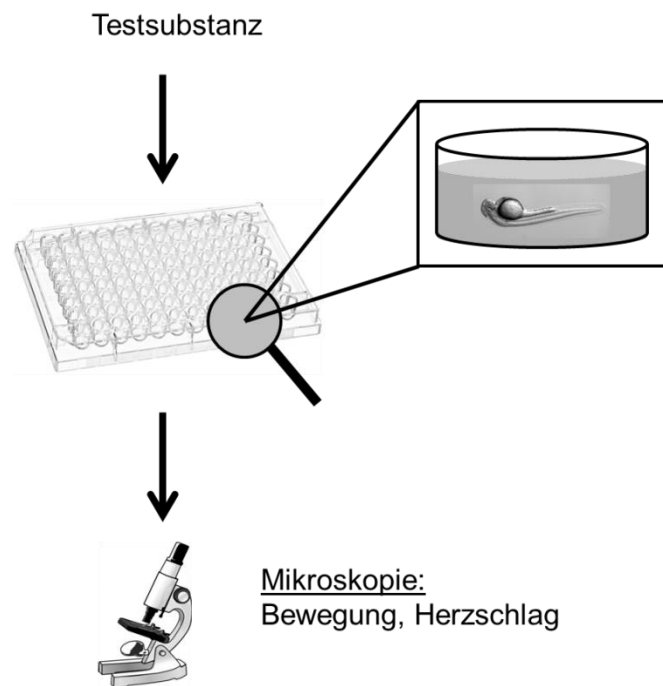
**Abb. 5-3: Entwicklungsstadien des Zebrafischembryos a) nach 4 Stunden b) nach 25 Stunden c) nach 50 Stunden [132]**

Die Ernährung des Embryos über den Dottersack macht in der ersten Lebenswoche eine Fütterung unnötig und damit die Nachzucht sehr einfach. Bereits einen Tag nach der Befruchtung ist der Embryo komplett als solcher zu erkennen. Am dritten Tag nach der Befruchtung kann der Zebrafischembryo bereits schwimmen und die meisten inneren Organe wie Herz, Leber, Niere und Verdauungstrakt sind vollständig

ausgebildet (siehe Abb. 5-3). Die Entwicklung des Embryos außerhalb des Mutterorganismus verläuft schnell und transparent [140]. Die inneren Organe der Zebrafischembryos lassen sich deshalb mittels einfacher Mikroskopie gut in den frühen Entwicklungsstadien beobachten. [132, 139, 141–143] Da der Zebrafisch ebenfalls den Wirbeltieren angehört, gleichen die meisten biologischen Prozesse des Zebrafisches weitgehend dem Menschen [144]. Um auch spätere Entwicklungsstadien der Organe und deren Funktion beobachten zu können, wurden gezielt genetische Manipulationen und Kreuzungen vorgenommen. Die Phänotypen der erzeugten Mutanten zeigen typische menschliche Krankheitsbilder. So ist es mit genetisch veränderten adulten Zebrafischen möglich, gezielt die Metastasierung eines implantierten Tumors zu beobachten. [145–147]

## **5.2 Toxikologisches Screening von Arzneistoffen**

Neben der oben erwähnten Möglichkeit der genetischen Manipulation von Zebrafischen zur gezielten Beobachtung von Metastasierung von implantierten Tumoren ist es auch möglich Zebrafische zu verwenden, die den Phänotyp eines bestimmten Krankheitsbildes aufweisen, um die Wirkung von potentiellen Arzneistoffen präklinisch zu untersuchen. Die wichtigste Anwendungsmöglichkeit des Zebrafischembryos ist jedoch der Einsatz für das Screening auf Arzneistofftoxizität, da viele klinische Studien von zunächst vielversprechenden Arzneistoffen aufgrund von unerwarteten toxischen Nebeneffekte abgebrochen werden müssen [138, 143]. Die *in vivo*-Toxizität von potentiellen Arzneistoffen wird standardmäßig in Mäusen, Raten oder Hunden untersucht. Das Toxizitätsscreening mit diesen Tieren ist jedoch ein sehr zeit- und kostenintensiver Schritt der Arzneistoffentwicklung, weshalb in den letzten Jahren verstärkt nach Alternativen gesucht wurde. Der Zebrafisch stellt aufgrund seiner hohen Nachkommenzahl, der transparenten Entwicklung des Embryos außerhalb des Mutterorganismus sowie der geringen benötigten Substanzmenge (der Zebrafisch ist wesentlich kleiner als andere Labortiere) eine solche Alternative dar und ermöglicht den vergleichsweise schnellen und preiswerten Einsatz zu *in vivo*-Screeningzwecken in der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung.



**Abb. 5-4: Übersicht über die Durchführung des Screening auf Toxizität im Zebrafischembryo**

Es werden Mengen der Testsubstanz im Nano- bzw. Mikrogrammbereich benötigt und das Experiment lässt sich von der Verpaarung der Fische bis zum Ergebnis in einer Woche durchführen. Für das Screening von Arzneistoffen auf Toxizität werden i.d.R. genetisch unveränderte Zebrafische verwendet, da in ersten präklinischen Experimenten unspezifische, generalisierte toxische Effekte von biologisch aktiven Substanzen identifiziert werden sollen. Bei dieser Methode wird die Testsubstanz nicht wie bei der Maus in das Versuchstier injiziert, sondern direkt in das Fischwasser, in dem die Zebrafischembryos leben, gegeben. Auf diesem Wege wird die Testsubstanz vom Zebrafisch über die Haut oder Kiemen absorbiert [148]. In Abb. 5-4 ist die Durchführung des Screening auf Toxizität von potentiellen Arzneistoffen in einem einfachen Schema zur Übersicht dargestellt. Die Zielparameter dieses Experiments sind die Letalität bzw. Überlebensrate der Zebrafischembryos sowie Fehlbildungen der Organe. Ein toter Fisch lässt sich leicht anhand eines fehlenden Herzschlages unter dem Mikroskop identifizieren. [137, 138, 143, 149] Bei einem entsprechenden Versuchsaufbau können verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz verwendet werden. So ist es möglich konzentrationsabhängige Effekte im Zebrafischembryo zu beobachten und eventuelle Rückschlüsse auf die therapeutische Breite des potentiellen Arzneistoffs zu ziehen. Diese therapeutische Breite bzw. die bestimmte  $LC_{50}$ -Konzentration (mittlere letale Konzentration, engl. *lethal concentration*)

der Testsubstanz im Zebrafisch sind natürlich nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Aktuelle Untersuchungen an über 100 Testsubstanzen des US-amerikanischen Krebsforschungszentrums National Cancer Institute (NCI) haben jedoch gezeigt, dass die erhaltenen  $LC_{50}$ -Werte im Zebrafisch mit den Zielparametern Teratogenität und Organtoxizität mit den bekannten  $LD_{50}$ -Werten (mittlere letale Dosis, ermittelt aus einer kontrollierten Einzeldosis) im Menschen auffallend ähnlich sind. Für die Arzneistoffentwicklung bietet der Zebrafisch ein einfaches Modell für die Beurteilung unspezifischer, toxischer Effekte der Testsubstanzen auf die Embryonalentwicklung und den Gesamtorganismus. Die erhaltenen Daten sind wertvoll für die weitere Forschung in der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung und könnten zu sicheren Arzneimitteln führen. Das hat die internationale Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) dazu veranlasst, ein Standardexperiment für das Toxizitätsscreening von potentiellen Arzneistoffstoffen mit dem Zebrafisch als Modellorganismus zu validieren. [137, 143]



## 6. Atomabsorptionsspektrometrie zur Analytik von Metallen im biologischen Material

Die Atomabsorptionsspektrometrie ist ein analytisches Verfahren zur quantitativen und qualitativen Analyse von verschiedenen Elementen, in erster Linie von Metallen und Halbmetallen. In der Arzneistoffentwicklung ist die hochsensitive Bestimmung von Metallen und Metallverbindungen in biologischem Material für die Untersuchung der Bioverteilung neuer potentieller Arzneistoffe, die ein Metall als Zentralatom enthalten, ein wichtiges Verfahren, das sich mit der instrumentellen Analysetechnik der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) realisieren lässt. [150]

Insbesondere die neuste Technik der hochauflösenden Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumsstrahler und verbesserter Untergrundkorrektur (HR-CS AAS, engl. *high-resolution continuum source AAS*) stellt ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Metallquantifizierung dar [151]. Das einzige derzeit auf dem Markt befindliche Gerät mit dieser instrumentellen Neuerung ist das contrAA® 700 von Analytik Jena (siehe Abb. 6-1).



**Abb. 6-1: contrAA® 700 von Analytik Jena am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig**

## 6.1 Messprinzip der Atomabsorptionsspektrometrie

Das Messprinzip der Atomabsorptionsspektrometrie beruht auf der Abschwächung der Intensität eines Lichtstrahls durch das Anregen von Atomen im Grundzustand. Zur Anregung von Atomen ist abhängig vom zu bestimmenden Element eine bestimmte Wellenlänge, die der Resonanzlinie entspricht, erforderlich.

Als Messgröße wird die Absorption ( $A_\lambda$ ) verwendet, die als Logarithmus des Verhältnisses der in die Probe eingestrahlten Lichtintensität ( $I_0$ ), zu der durch die Atome abgeschwächten Lichtintensität ( $I$ ) definiert ist.

$$A_\lambda = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c b$$

**Formel 6-1: Lambert-Beer'sche Gesetz ( $A_\lambda$ : Absorption,  $I_0$ : eingestrahlte Lichtintensität,  $I$ : abgeschwächte Lichtintensität,  $c$ : Konzentration,  $b$ : Schichtdicke)**

Die Beziehung zwischen der Absorption ( $A_\lambda$ ), Schichtdicke ( $b$ ) und Konzentration einer Lösung ( $c$ ) wird mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz [152] beschrieben, welches bei der Atomabsorptionsspektroskopie ebenfalls praktische Bedeutung besitzt. Der Proportionalitätsfaktor des Gesetzes ist der molare Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$ , der der Absorption einer einmolaren Lösung bei einer Schichtdicke  $b$  von 1 cm und der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht. Das Lambert-Beer'sche Gesetz wurde im Jahr 1852 von August Beer als Erweiterung des von Pierre Bouguer [153] und Johann Heinrich Lambert [154] mehr als 1000 Jahre zuvor formulierten Gesetz definiert. Für die Atomabsorptionsspektrometrie gilt es streng genommen nur mit Einschränkungen, da die Schichtdicke und der Atomabsorptionskoeffizient bei der AAS aufgrund der schwankenden Versuchsbedingungen keine konstanten Größen darstellen. Für niedrige Konzentrationen ist es dennoch von praktischer Relevanz. Mithilfe von Standardlösungen einer Referenz werden die Absorptionen bekannter Konzentrationen gemessen und eine Kalibriergerade erstellt. Aus dieser Kalibriergerade können die Konzentrationen unbekannter Lösungen bei bekannter Absorption abgelesen werden. Man bezeichnet dieses Messverfahren auch als relatives Messverfahren, weil immer der Vergleich mit Referenzstandards für die Auswertung erforderlich ist.

## 6.2 Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers

Ein Atomabsorptionsspektrometer besteht im Wesentlichen aus vier Bauteilen: der Lichtquelle, der Atomisierungseinheit, dem Monochromator und dem Detektor [155]. Der Aufbau ist in Abb. 6-2 am Beispiel eines hochauflösenden Atomabsorptionsspektrometers mit Kontinuumsstrahler schematisch dargestellt.

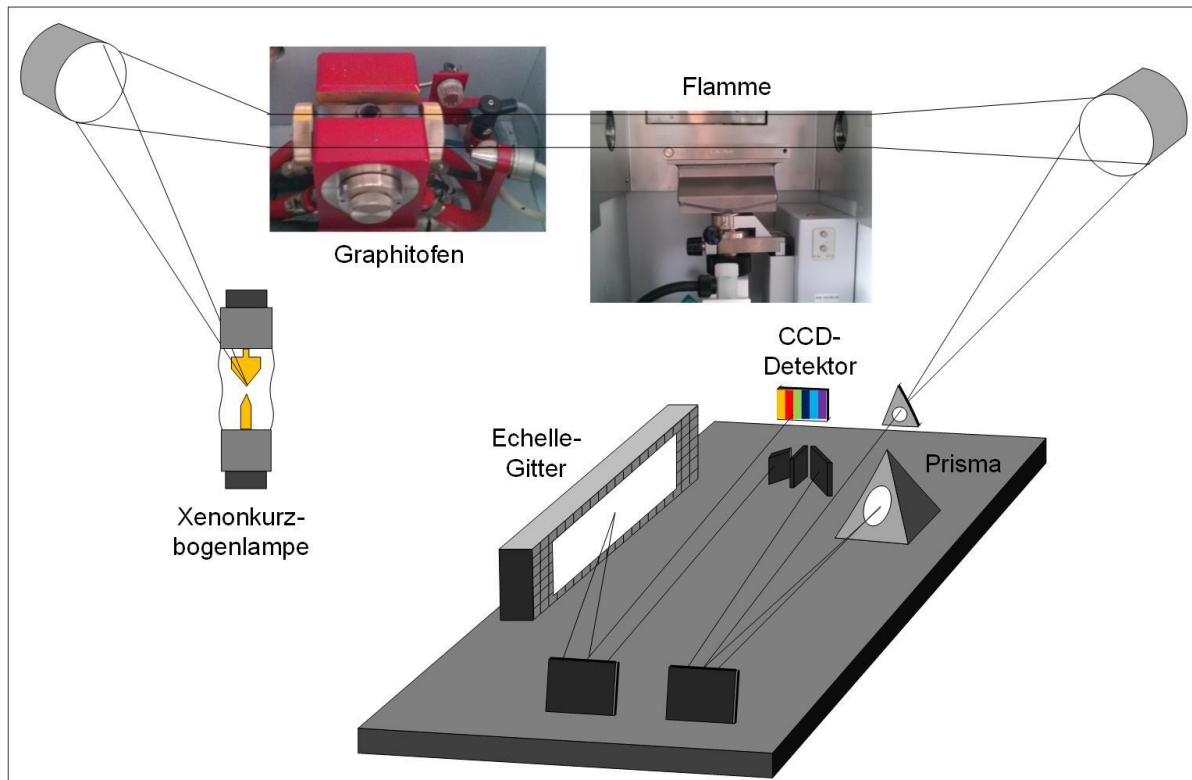


Abb. 6-2: Schematischer Aufbau einer HR-CS AAS nach Resano *et al.* und Welz *et al.* [156, 157]

Die Lichtquelle ist bei der hochauflösenden Atomabsorptionsspektrometrie eine Xenonkurzbogenlampe. Dabei handelt es sich um eine kontinuierliche Strahlungsquelle, die für den gesamten Spektralbereich von 190-900 nm eingesetzt werden kann. In der Atomisierungseinheit erfolgt die Atomisierung der Atome, wobei sie in den gasförmigen Zustand überführt werden. Zur Atomisierung können Flammen oder Graphitrohröfen eingesetzt werden. Je nach verwendeter Atomisierungseinheit werden die ergänzenden Bezeichnungen Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS) bzw. Graphitrohröfen-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) verwendet. Bei der F-AAS wird die Probe bevor sie in die Luft-Acetylen-Flamme zur Atomisierung gelangt mit Hilfe eines Zerstäubers in ein Aerosol überführt. Bei der GF-AAS wird eine definierte Probenmenge in ein Graphitrohr injiziert, wo sie durch Erhitzen atomisiert wird. Das Aufheizen des Graphitrohrs erfolgt in mehreren Temperaturschritten, die ge-

meinsam zu einem optimalen Messsignal mit minimalem Untergrund beitragen. Die einzelnen Schritte und die Relevanz eines Standardprogramms der GF-AAS ist in Tab. 6-1 gelistet.

**Tab. 6-1: Standard-Temperatur-/Zeitprogramm für die GF-AAS**

<b>Schritt</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>
1. Trocknung:	Lösungsmittel werden entfernt und die Probe wird getrocknet.	max. 100 °C
2. Trocknung:	Vollständige Trocknung der Probe	max. 400 °C
3. Pyrolyse:	Entfernen von organischem Material	400-1500 °C
4. Atomisierung:	Bei einer elementspezifischen Temperatur wird die Probe atomisiert.	1500-2600 °C
5. Ausheizen:	Bei hohen Temperaturen um Probenreste im Graphitrohr vollständig zu entfernen.	2500-2800 °C

Der Monochromator isoliert aus dem gesamten Lichtspektrum eine bestimmte Wellenlänge. Dafür werden Gitter verwendet, die den Lichtstrahl beugen. Die Zahl der Gitterfurchen bestimmt dabei die Auflösung. In der HR-CS AAS ist ein Echelle-Gitter verbaut, bei dem es sich um ein besonders effizientes Beugungsgitter handelt. Dieses ist zusätzlich mit einem Prisma kombiniert. Diese Kombination ermöglicht die simultane Erfassung mehrerer Wellenlängen.

In der Atomabsorptionsspektrometrie wird ein CCD-Detektor, ein Sekundärelektronenvervielfacher, zur Messung der Lichtintensität verwendet. Das Besondere an dem Detektor ist, dass jedes Pixel unabhängig voneinander und simultan ausgewertet werden kann. Dadurch wird ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis erhalten und mithilfe von Korrekturpixeln (Pixel abseits der gemessenen zentralen Pixel) können Interferenzen wie z.B. eine kontinuierliche Untergrundabsorption erfasst und eliminiert werden. Es ist eine Auswertung über einen Bereich von 200 Pixeln möglich.

Ein klassisches Atomabsorptionsspektrometer unterscheidet sich von dem hier erläuterten hochauflösenden Atomabsorptionsspektrometer mit Kontinuumsstrahler in einigen Bauteilen. Die Unterschiede sowie Vor-/Nachteile sind unter 6.3 näher erläutert.

### 6.3 Vorteile der HR-CS AAS gegenüber der AAS

Die Vorteile der hochauflösenden Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumsstrahler gegenüber der klassischen Atomabsorptionsspektrometrie liegen in der Xenonkurzbogenlampe, bei der es sich um eine kontinuierliche Strahlungsquelle handelt, und dem CCD-Detektor, der simultan und unabhängig arbeitet [158]. Aufgrund der Xenonkurzbogenlampe entfällt der Wechsel der Hohlkathodenlampe zwischen den Messungen unterschiedlicher Elemente. Sie kann für den gesamten Spektralbereich von 190 bis 900 nm eingesetzt werden. Das erleichtert die Handhabung von Routinemessungen enorm und bietet zudem eine Zeitersparnis, was die AAS-Messung und damit die Arzneistoffentwicklung effizienter macht. Durch die höhere Strahlungsintensität der Xenonkurzbogenlampe wird außerdem das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

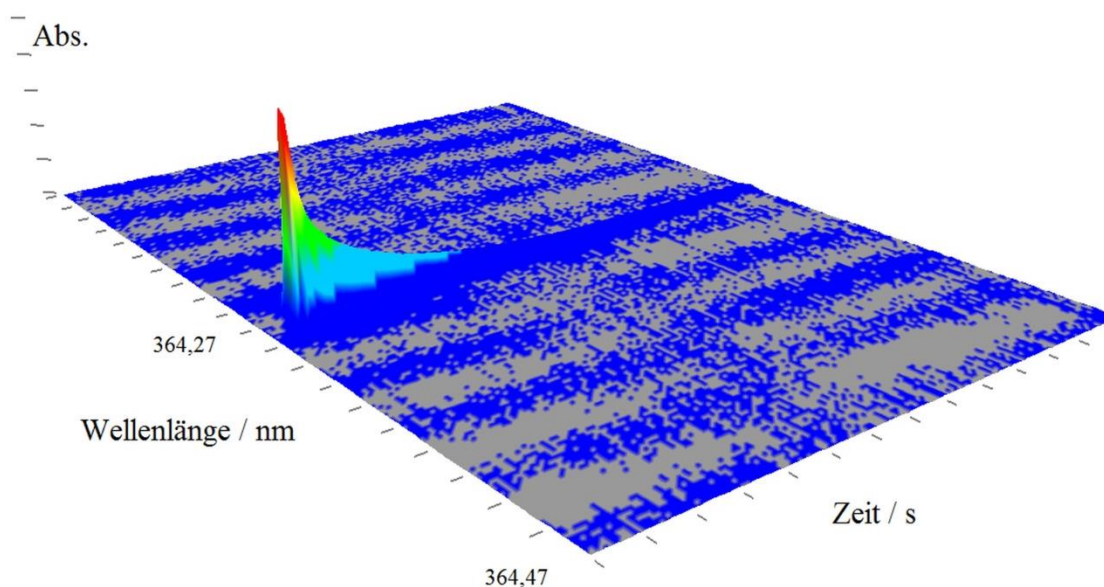


Abb. 6-3: 3D-HR-CS AAS-Signal von Titan (1,5 ppm) bei 364,27 nm

Mithilfe des CCD-Detektors kann ein spektraler Bereich von 200 Pixel, was etwa 0,4 nm entspricht, vermessen werden. Deshalb liefert die neue hochauflösende Technik im Gegensatz zur klassischen AAS, wo nur bei einer Wellenlänge gemessen werden

kann, ein Signal mit 3 Dimensionen (3D-Signal). Neben der Zeit und Absorption ist als dritte Achse die Wellenlänge dargestellt. (siehe Abb. 6-3) Das bietet den großen Vorteil, dass Informationen über die spektrale Umgebung abseits des Analytensignals erhalten werden. Die Untergrundgrundkorrektur der HR-CS AAS korrigiert mögliche spektrale Störungen vollautomatisch und erleichtert die Messroutine zusätzlich. Außerdem wird die Entwicklung neuer Methoden für beispielsweise die zuverlässige Elementquantifizierung in komplizierten biologischen Matrices durch das Sichtbarmachen spektraler Interferenzen für den Analytiker stark erleichtert. [156, 157]

Einen weiteren Vorteil der HR-CS AAS ist die bessere Auflösung, die durch die Verwendung eines Doppelmonochromators (Echelle-Gitter und Prisma) bedingt ist.

Alle genannten Vorteile der HR-CS AAS zur klassischen AAS sind in Tab. 6-2 in einer vergleichenden Übersicht zur besseren Veranschaulichung dargestellt.

**Tab. 6-2: Übersicht der Vorteile der HR-CS AAS**

<b>AAS[159]</b>	<b>HR-CS AAS[158]</b>
2D-AAS-Signal	3D-AAS-Signal
nicht für jedes Element sofort messbereit	messbereit für jedes Element und jede Wellenlänge
Hohlkathodenlampe: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Messung einer bestimmten Wellenlänge</li> </ul>	Xenonkurzbogenlampe: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Messung über den gesamten Spektralbereich von 190-900nm</li> <li>▪ Besseres Signal-Rauch-Verhältnis</li> </ul>
Prisma oder Gitter	Doppelmonochromator für eine höhere Auflösung
Limitierte Leistung der Untergrundkorrektur durch Deuteriumlampe	Simultanmessung von Atomabsorption und Untergrundabsorption durch CCD-Zeile <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vollautomatische und bessere Untergrundkorrektur</li> </ul>

### **III Biochemische Untersuchungen zum Wirkmechanismus von neuartigen Titan(IV)-Komplexen**

## 7. Synthese von neuartigen Titan(IV)-Komplexen

Die Synthesen der Titan-Salan-Komplexe (siehe Abb. 7-1) wurden am Institut für Anorganische Chemie der Hebrew University of Jerusalem in Israel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Edit Tshuva durchgeführt.

Die Synthese des Titankomplexes Titanocen Y wurde an der UCD School of Chemistry and Chemical Biology des University College Dublin in Irland im Arbeitskreis von Dr. Matthias Tacke durchgeführt [30].

### 7.1 Synthese und Stabilität von Titan-Salan-Komplexen

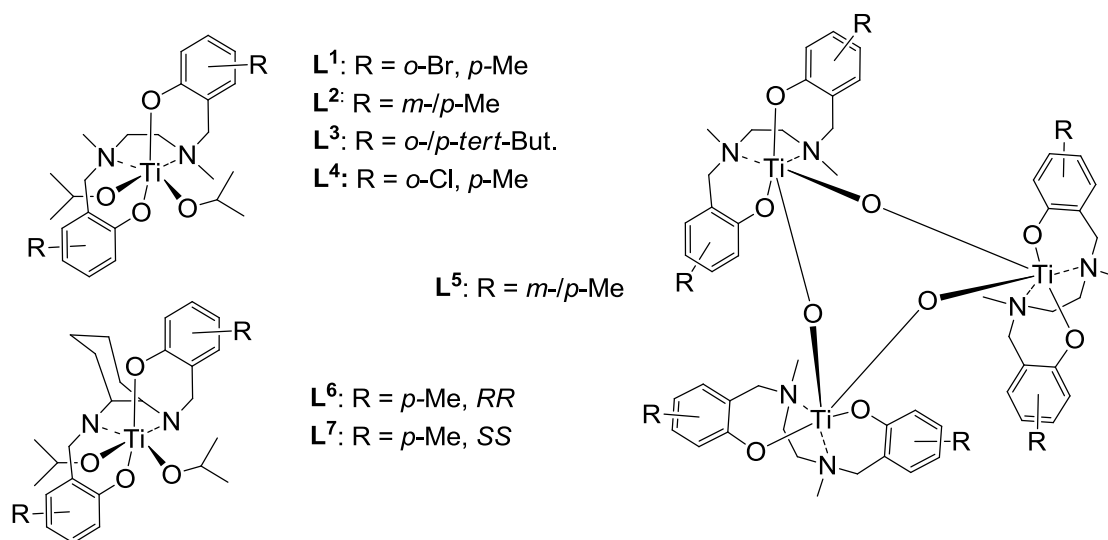
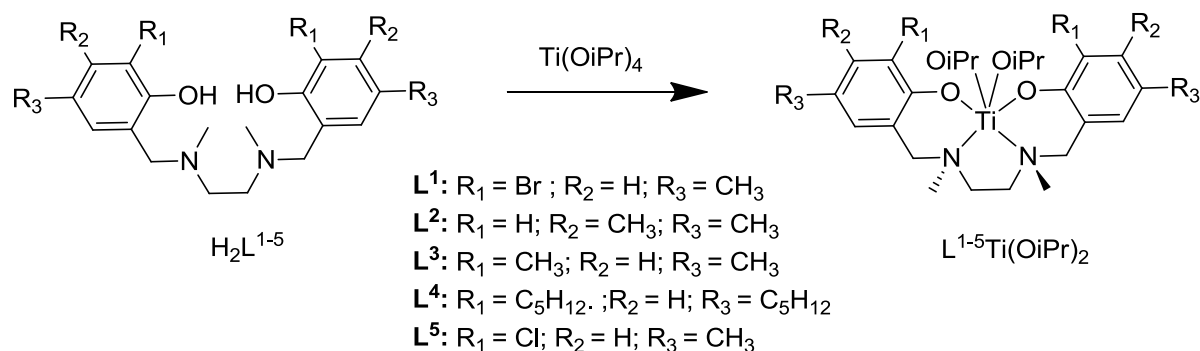


Abb. 7-1: Titan-Salan-Komplexe  $Ti(L^{1-7})(OiPr)_2$

Bei den Titan-Salan-Komplexen handelt es sich um eine neue Titan(IV)-Komplex-Familie, bei der das Titanatom N/O-kordiniert ist und die ein Diaminobisphenolato (Salan)-Liganden als Rückgrad besitzt. Die Titan-Salan-Komplexe  $Ti(L^{1-5})(OiPr)_2$  wurden bei Raumtemperatur aus den entsprechenden Liganden  $H_2L^{1-5}$  als Präkursor nach einer bereits publizierten Methode in einer Ein-Schritt-Reaktion synthetisiert [160–163]. Dazu wurde  $H_2L^{1-5}$  mit einem Äquivalent  $Ti(OiPr)_4$  in Diethylether bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre umgesetzt (siehe Abb. 7-2). Die entstandenen gelben Kristalle wurden durch Einengen am Rotationsverdampfer und/oder Filtration isoliert.





**Abb. 7-2: Syntheschema der Titan-Salan-Komplexe  $\text{Ti}(\text{L}^{1-5})(\text{OiPr})_2$**

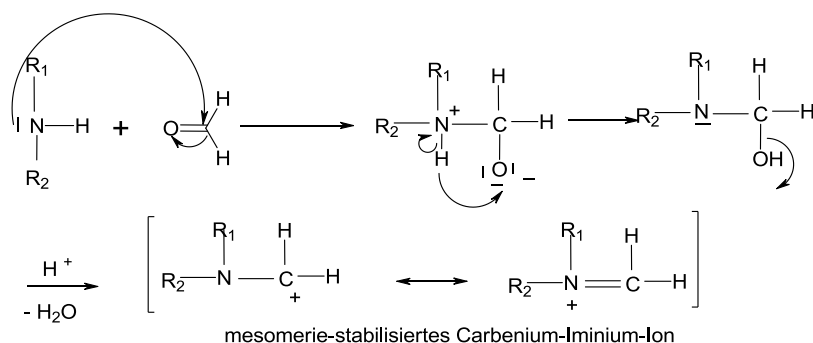
Es wurden dabei quantitative Ausbeuten erzielt. Die synthetisierten Titan-Salan-Komplexe sind  $\text{C}_2$ -symmetrische Komplexe mit den beiden Phenolato-Gruppen in *trans*-Position und den beiden Isopropoxo-Gruppen in *cis*-Position.

Die Liganden  $\text{H}_2\text{L}^{1-5}$  wurden zuvor aus dem entsprechend substituierten Phenol, Formaldehyd und dem *N,N*-disubstituierten Amin in einer Mannich-Reaktion hergestellt [164]. Die Mannich-Reaktion ist eine bekannte Namensreaktion der Organischen Chemie. Dabei handelt es sich um die Aminoalkylierung von einer CH-aciden Verbindung (hier: Alkin) mit einem Aldehyd (hier: Formaldehyd) und einem primären oder sekundären Amin (hier: *N,N*-disubstituierten Amin). Formal ist die Mannich-Reaktion eine Kondensationsreaktion, da während der Reaktion Wasser abgespalten wird. Der Mechanismus der Reaktion (siehe Abb. 7-3) kann in zwei Schritte aufgeteilt werden:

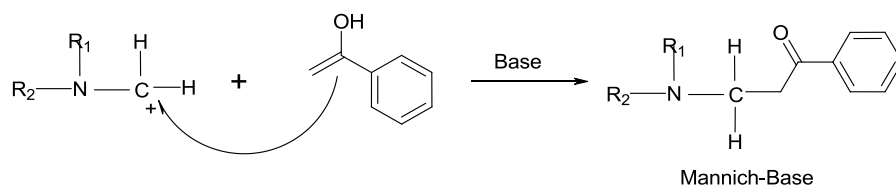
1. Bildung des mesomerie-stabilisierten Carbenium-Iminium-Ions
2. Aminoalkylierung der CH-aciden Verbindung

Man erhält so eine  $\beta$ -Aminocarbonylverbindung, die auch als Mannich-Base bezeichnet wird.

## 1. Schritt:



## 2. Schritt:



## hier:

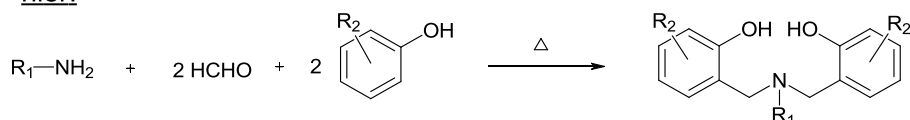
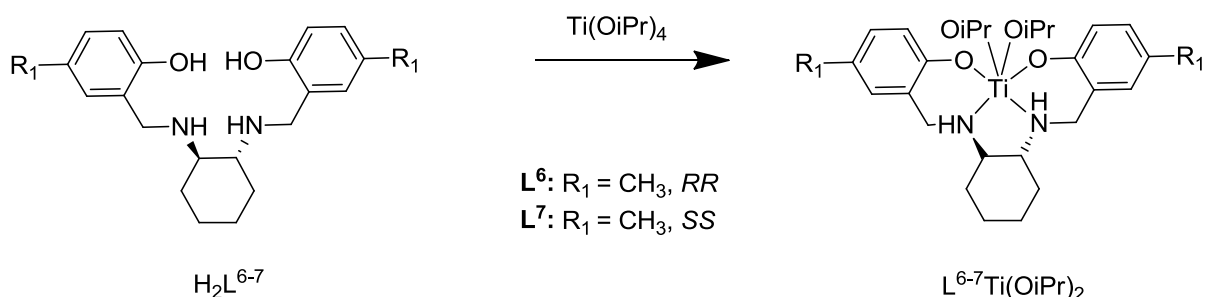


Abb. 7-3: Reaktionsmechanismus der Mannich-Reaktion

Die Liganden  $H_2L^{6-7}$  für die Synthese der Titan-Salan-Komplexe  $Ti(L^{6-7})(OiPr)_2$  wurden nach einer alternativen Methode hergestellt, da die Mannich-Reaktion ein unerwünschtes Produkt lieferte [165]. Dazu wurde eine Zwei-Schritt-Reaktion, die auf der Kondensation eines 2-Hydroxy-5-methylbenzaldehyds mit dem SS- bzw. *RR*-1,2-Diaminocyclohexan und anschließender Reduktion mit  $NaBH_4$  beruht, durchgeführt [166, 167]. Die erhaltenen Enantiomere  $H_2L^6$  und  $H_2L^7$  wurden anschließend, wie oben für die Liganden  $H_2L^{1-5}$  beschrieben, mit  $Ti(OiPr)_4$  in Tetrahydrofuran (THF) unter Argon-Atmosphäre zu den Titan-Salan-Komplexen  $Ti(L^6)(OiPr)_2$  und  $Ti(L^7)(OiPr)_2$  umgesetzt (siehe Abb. 7-4).


 Abb. 7-4: Stereoselektive Synthese der Titan-Salan-Komplexe  $Ti(L^{6-7})(OiPr)_2$

Auf die Identität, Strukturaufklärung und stereoselektive Reinheit der Titan-Salan-Komplexe wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen, da die entsprechenden Daten in verschiedenen Publikationen nachzulesen sind [37, 160, 168–171].

**Tab. 7-1: Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) ausgewählter Titan-Salan-Komplexe in  $H_2O/THF$  (1:9) bei RT. (MW  $\pm$  Stabw.)**

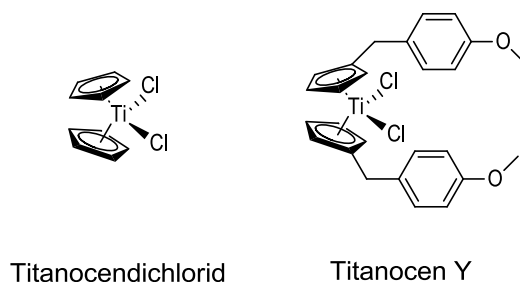
Komplex	$t_{1/2}$ (h)
$Ti(L^1)(OiPr)_2$	$290 \pm 30$ [171]
$Ti(L^2)(OiPr)_2$	5 [170]
$Ti(L^5)(OiPr)_2$	$130 \pm 30$ [171]

Für die biologische Testung potentieller Arzneistoffe und deren weitere Entwicklung spielt die hydrolytische Stabilität eine entscheidende Rolle. In verschiedenen Experimenten (UV/Vis- und  $^1H$ -NMR-basierte Studien, Kristallstrukturanalyse) wurden repräsentative Vertreter der neuen Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe hinsichtlich ihrer Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen untersucht [170, 171]. Wie in Tab. 7-1 zu sehen ist, weisen die Titan-Salan-Komplexe eine Halbwertszeit von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen auf.

Für alle folgenden biochemischen Untersuchungen wurde die *o*-Bromid-substituierte Verbindung  $Ti(L^1)(OiPr)_2$  als Leitstruktur der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe ausgewählt.

## 7.2 Synthese, Strukturaufklärung und Stabilität von Titanocen Y

Bei dem Titankomplex Titanocen Y handelt es sich um einen Sandwichkomplex, der sich von der Leitsubstanz Titanocendichlorid (siehe 1.3.1), welches sich in den 1990er in der klinischen Prüfung befand, nur durch einen zusätzlichen *p*-Methoxybenzyl-Liganden am Cyclopentadienyl-Ringsystem unterscheidet (siehe Abb. 7-5). Dadurch wird eine bessere Wasserlöslichkeit und hydrolytische Stabilität erzielt (siehe 1.3.1).

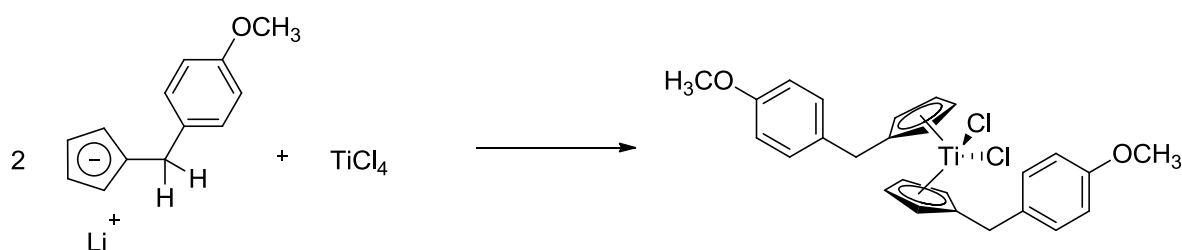


**Abb. 7-5: Strukturen relevanter Titanocene**

Die Synthese von Titanocen Y erfolgte ausgehend vom Lithium-cyclopentadienyl-Intermediat in Tetrahydrofuran (THF) durch Hinzugabe eines halben Äquivalentes  $\text{TiCl}_4$  bei 0 °C und anschließendem Rückflusserhitzen für 16 Stunden (siehe Abb. 7-6). Nach verschiedenen Filtrations- und Aufreinigungsschritten wurde das Produkt als braunes Pulver mit ca. 50 %-iger Ausbeute erhalten. [30]

Auf die Reinheit und Strukturaufklärung von Titanocen Y wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen, da die entsprechenden Daten publiziert worden sind [30].

Die Halbwertszeit von Titanocen Y in Wasser liegt bei über 168 Stunden (unpublizierte Daten von Dr. Matthias Tacke, UCD School of Chemistry and Chemical Biology, University College Dublin).



**Abb. 7-6: Syntheschema von Titanocen Y**

### 7.3 Zusammenfassung

Die neuartigen Titan(IV)-Komplexe mit Salan- bzw. Cyclopentadienyl-Liganden wurden mit ausreichender Reinheit erfolgreich synthetisiert und charakterisiert.

## 8. Entwicklung einer HR-CS AAS-Methode zur Titanquantifizierung

Um die Bioverteilung und Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs zu untersuchen, ist die quantitative Bestimmung der Wirkstoffkonzentration in der Zelle unerlässlich. Ob ein Arzneistoff in die Zelle aufgenommen wird oder nicht, ist außerdem für die Identifikation des Arzneistofftargets eine wichtige Information (siehe Kapitel 3).

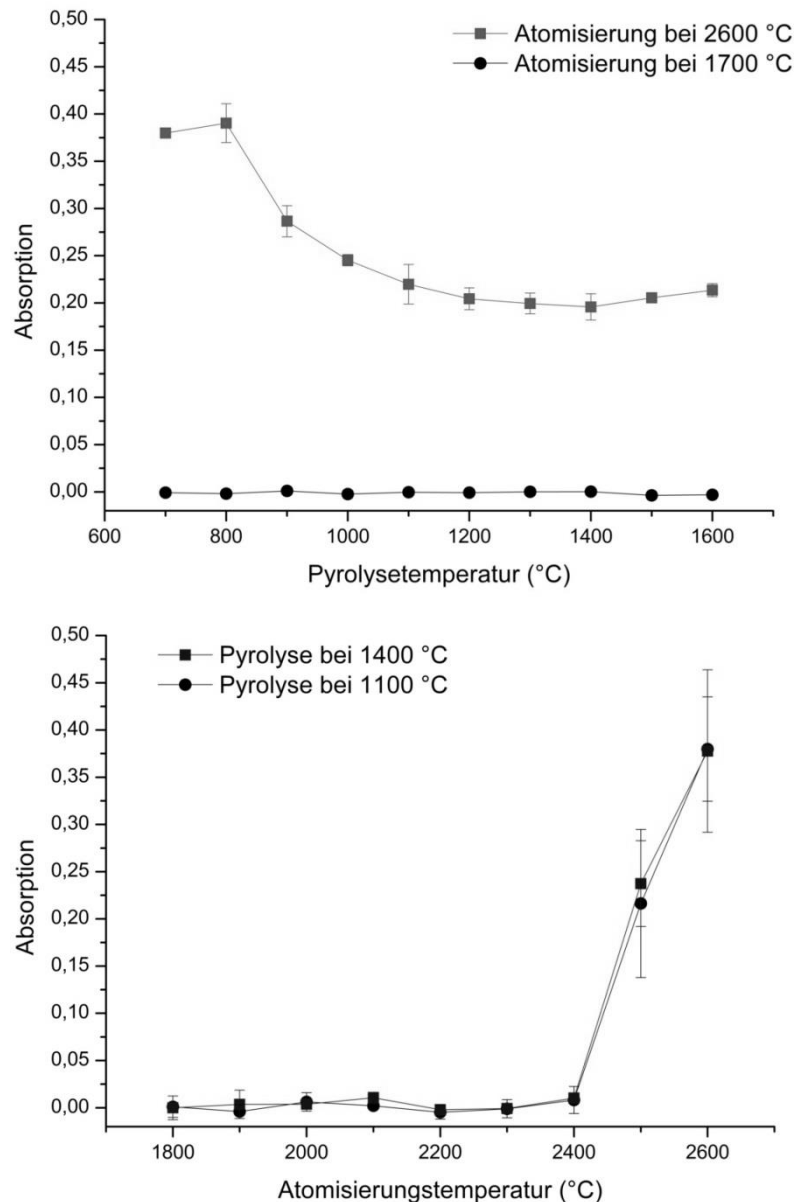
Für die Quantifizierung der zellulären Konzentration von metallbasierten Wirkstoffen stellt die hochauflösende Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumsstrahler (HR-CS AAS) ein selektives und sensitives Verfahren dar (siehe 6.3). Es ist eine neue AAS-Technologie, die eine simultane Untergrundkorrektur bietet und Metalle mit niedrigen Nachweisgrenzen bestimmen kann. [150, 172–175] Daneben existieren weitere hoch entwickelte Analysetechniken, wie die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) oder die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF), die sich für die Bestimmung von Spurenmetallkonzentrationen eignen [176–178].

In der Literatur sind wenige Publikationen über die Titanquantifizierung in biologischem Material zu finden. Einhäuser *et al.* berichten über eine Bestimmung mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) und konventioneller Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) [179]. Für die Untersuchung der Zellaufnahme und Bioverteilung von Titankomplexen sollte eine HR-CS AAS-basierte Methode entwickelt werden, die bekannte Probleme der AAS-basierten Titanbestimmung, wie *Memory*-Effekte, *Tailing* [179, 180] und Überrolleffekte [181, 182], weitgehend eliminiert. Die Optimierung des Analyseverfahrens zur Titanquantifizierung in biologischem Material umfasste die Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms des Graphitofens und die Untersuchung von Matrix- und Modifikatoreffekten auf das erhaltene Messsignal sowie die gemessenen Absorptionswerte. Auch eine kurze Validierung der neuen Methode wurde durchgeführt. Die genauen Versuchsbedingungen sind unter 20.2.1 nachzulesen.

## 8.1 Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms

Der erste Schritt des Optimierungsprozesses beinhaltete die Anpassung der verschiedenen Trocknungsschritte des Temperatur-/Zeitprogramms. Dabei handelte es sich um einen wichtigen Schritt, da sichergestellt werden musste, dass keine organischen Lösemittel und wässrigen Bestandteile mehr in der Probe sind, bevor die Pyrolyse, bei der das verbleibende organische Material, die sog. Matrix, entfernt wird und die abschließende Atomisierung des Metallatoms erfolgt. Dafür wurde die integrierte Ofenkamera des verwendeten HR-CS AAS-Instruments verwendet, mit dessen Hilfe die Probe kontinuierlich beim Ablauf der Trocknungsschritte hinsichtlich Blasenbildung und verbleibenden flüssigen Bestandteilen beobachtet werden konnte. Die anschließende Optimierung der Atomisierungs- und Pyrolysetemperatur erfolgte nach einer von Welz *et al.* publizierten Methode [159, 183]. Die Methode basiert auf einer schrittweisen Erhöhung der Pyrolysetemperatur um 100 °C, während die Atomisierungstemperatur konstant bei einer bestimmten Temperatur gehalten wird. Die Optimierung der Atomisierungstemperatur erfolgte in analoger Weise: die Atomisierungstemperatur wurde schrittweise erhöht, während die Pyrolyse bei einer definierten Temperatur erfolgte.

In einem ersten Experiment zur Optimierung der Pyrolyse wurde die Atomisierungstemperatur auf 2600 °C eingestellt, im zweiten Experiment lag sie bei 1700 °C. Die Pyrolysetemperatur wurde in beiden Experimenten in 100 °C-Schritten von 700 °C bis 1600 °C erhöht. Die Temperaturerhöhung bei einer Atomisierungstemperatur von 2600 °C führte zu einem anfänglich starken Verlust der Signalintensität und einem sich anschließenden Plateau bei einer Pyrolysetemperatur von 1100 °C bis 1600 °C (siehe Abb. 8-1 oben). Im zweiten Experiment, bei der die Atomisierungstemperatur 1700 °C betrug, konnte bei keiner der verwendeten Pyrolysetemperaturen im Bereich von 700 °C bis 1600 °C eine Absorption gemessen werden.

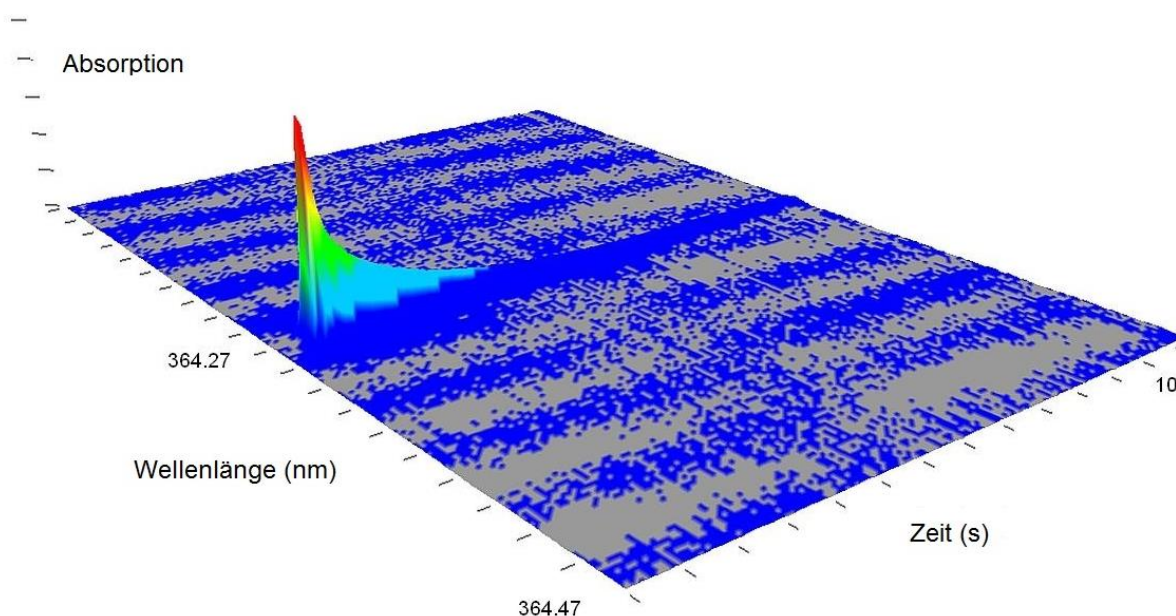


**Abb. 8-1: Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms im Graphitofen mit wässrigen Titan-Standardlösungen ( $c = 1500 \mu\text{g/L}$ ). Oben: Pyrolysetemperatur, unten: Atomisierungstemperatur. (MW  $\pm$  Stabw.,  $n = 2$ )**

Für die Optimierung der Atomisierungstemperatur wurden zwei verschiedene Pyrolysetemperaturen aus dem konstanten Plateaubereich (1100-1600 °C) ausgewählt. Die gewählten Pyrolysetemperaturen von 1100 °C und 1400 °C führen zwar zu einem Verlust der Signalintensität (im Vergleich zur Intensität bei einer niedrigeren Pyrolysetemperatur), jedoch bieten sie den Vorteil einer robusteren Methode, weil Temperaturveränderungen einen geringeren Einfluss hatten. Der Optimierungsprozess startete bei einer Atomisierungstemperatur von 1800 °C und zeigte einen starken An-

stieg der Signalintensität bei Atomisierungstemperaturen über 2400 °C (siehe Abb. 8-1 unten). Diese Beobachtung erklärte zudem die fehlenden Absorptionswerte bei einer Atomisierungstemperatur von 1700 °C im ersten Experiment. Atomisierungstemperaturen über 2600 °C wurden nicht untersucht, da sich hohe Temperaturen auf die Lebensdauer des Graphitrohrs auswirken, was die Analyse­methode aus wirtschaftlichen Gründen unattraktiv machen würde. Wie aus dem vorherigen Experiment erwartet, lieferten beide verwendeten Pyrolysetemperaturen ähnliche Signalintensitäten.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse wurde für die Pyrolyse eine Temperatur von 1400 °C und für die Atomisierung eine Temperatur von 2600 °C für alle weiteren Titanmessungen gewählt. Zusätzlich wurden dem Temperatur-/Zeitprogramm zwei Ausheizschritte hinzugefügt, um die für Titan-HR-CS AAS-Signale bekannten *Memory-Effekte*, die auf der Carbidbildung des Titans mit dem Graphitrohr beruhen, zu vermeiden (siehe 20.2.2 für eine tabellarische Übersicht des optimierten Temperatur-/Zeitprogramms).



**Abb. 8-2: 3D-HR-CS AAS-Signale von Titan bei 364,2675 nm nach der Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms**

In Abb. 8-2 ist das HR-CS AAS-Signal nach der Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms dargestellt. Zum Vergleich ist in Abb. 8-3 das HR-CS AAS-Signal vor dem Optimierungsprozess mit den nicht idealen Temperaturen für den Atomisie-



rungs- und Pyrolyseschritt zu sehen. Es ist ein Signal zu sehen, das rasch ein Maximum erreicht, welches danach aber zuerst wieder abfällt bevor es erneut ansteigt (Überrolleffekt) und schlußendlich langsam zur Basislinie zurückkehrt (*Tailing*). Diese beiden Effekte (*Tailing* und Überrolleffekt) sind, wie der *Memory*-Effekt, in der Carbidbildungsneigung des Titans begründet.

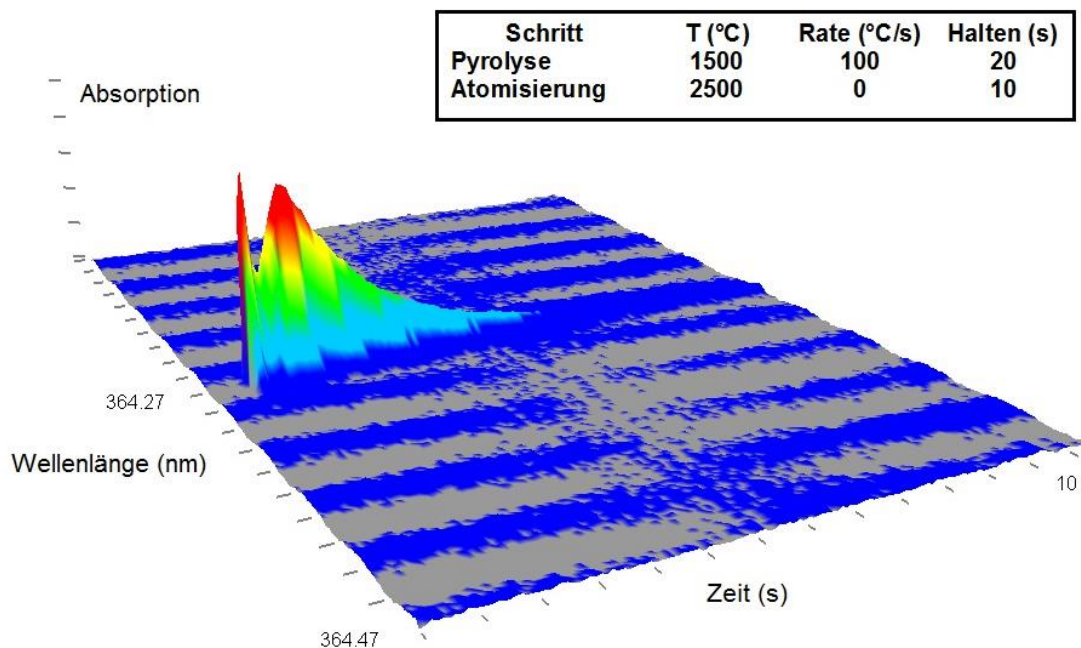
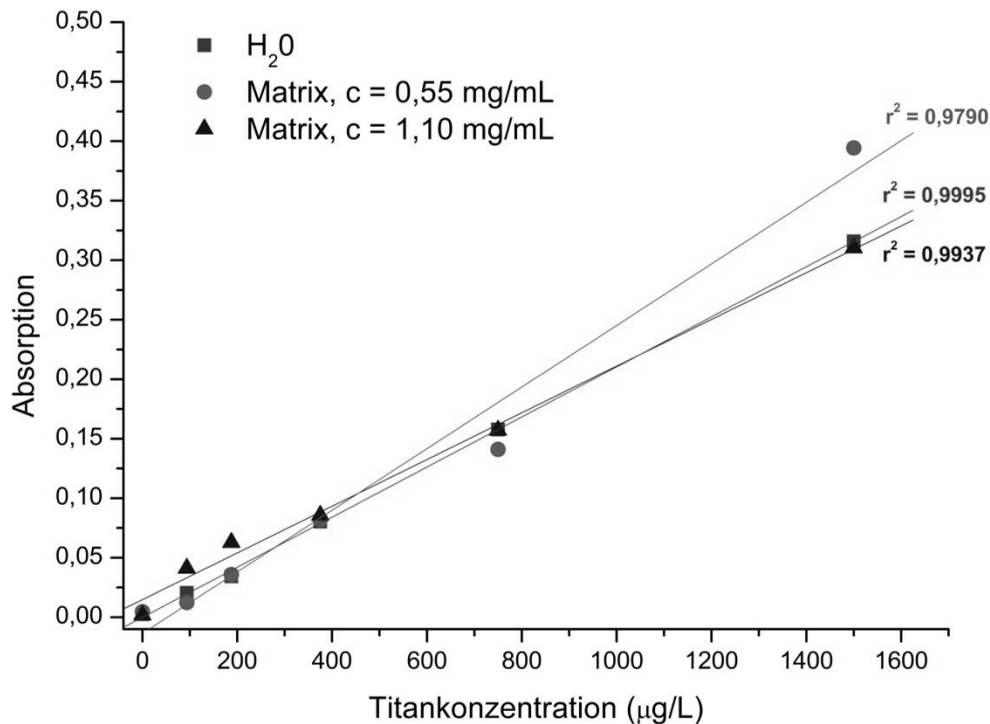


Abb. 8-3: 3D-HR-CS AAS-Signale von Titan bei 364,2675 nm vor der Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms

## 8.2 Untersuchung von Matrix- und Modifikatoreffekten

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Proteinkonzentration einer Probe einen Einfluss auf die Intensität des HR-CS AAS-Messsignals haben kann [183–185]. Da mit dem optimierten Temperatur-/Zeitprogramm für Titanbestimmungen Messungen in biologischem Material, das per se hohe Proteinkonzentrationen sowie verschiedene Anionen und Kationen enthält, durchgeführt werden sollen, wurde der Einfluss der sog. Matrix auf die gemessene Absorption näher untersucht. Dazu wurden in zusätzlichen Experimenten die gemessenen Absorptionen von wässrigen Titan-Standardlösungen mit den erhaltenen Werten für Titanproben, die einen bestimmten Proteingehalt aufweisen, verglichen. Als Matrix wurde eine Zellsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,55 mg/mL, sowie einer doppelt so hohen Proteinkonzentration (1,10 mg/mL) verwendet. Es wurden Messungen mit zwei verschiedene Pro-

teinkonzentrationen durchgeführt, um Informationen darüber zu erhalten, ob nur die Anwesenheit von Matrixbestandteilen relevant für eine eventuelle Abschwächung des Messsignals ist oder ob konzentrationsabhängige Effekte zu beobachten sind. Die Ergebnisse sowie die berechneten linearen Funktionen der drei Messreihen sind in Abb. 8-4 dargestellt.



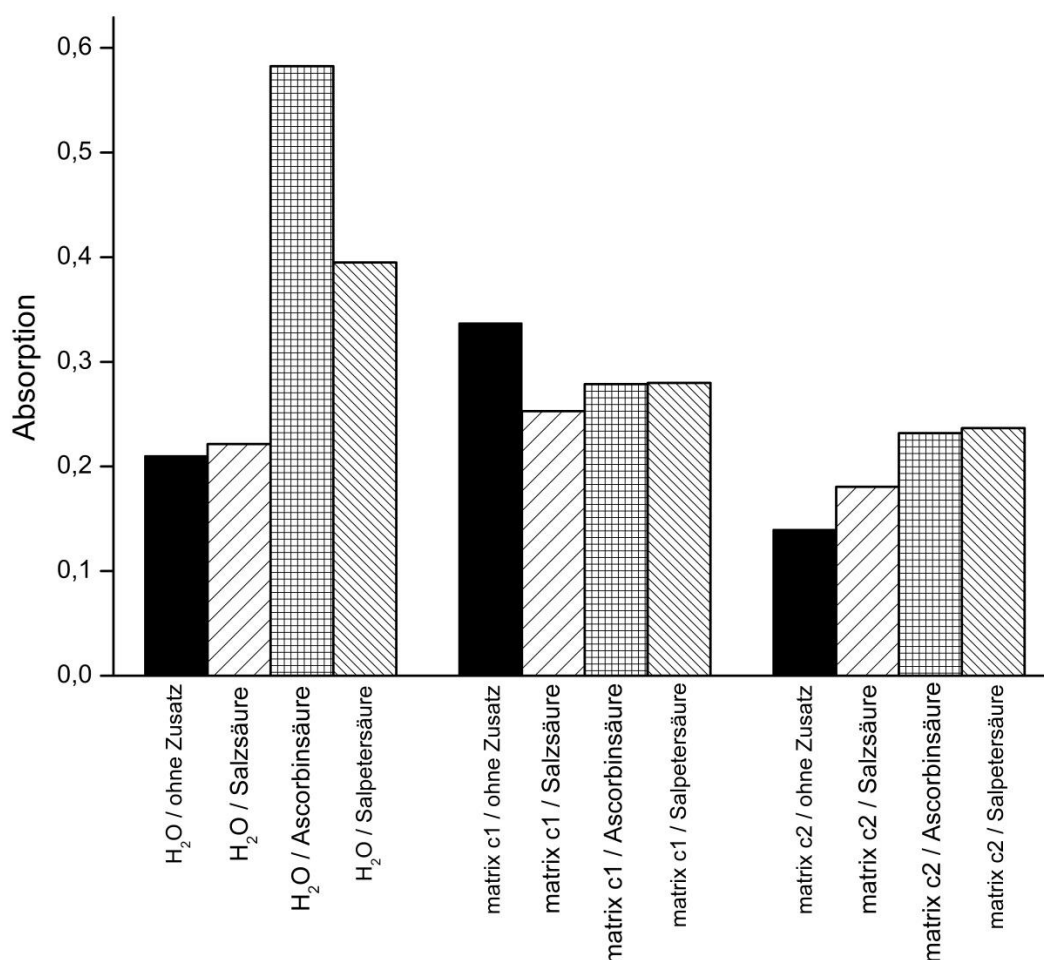
**Abb. 8-4: Einfluss der Matrixproteinkonzentration auf die Signalintensität von Titan-Standardlösungen. (MW, n = 3)**

Bei Verwendung des zuvor optimierten Temperatur-/Zeitprogramms für Titanmessungen (siehe 8.1) zeigen die Kalibrierfunktionen der wässrigen Proben als auch der Matrix-Proben eine ausreichende Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten  $r^2$ , der größer als 0,970 ist. Der Korrelationskoeffizient stellt ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs dar.

Bei einem direkten Vergleich der erzielten Absorptionswerte für die wässrigen Proben und Matrix-Proben bei gleicher Titankonzentration, sind jedoch insbesondere bei geringen Titankonzentrationen abweichende Werte zu erkennen.

Neben dem Einfluss der biologischen Matrix auf die Intensität des Absorptionssignals wurde auch der Einfluss verschiedener Detergenzien, den sog. Modifikatoren, untersucht. Der Zusatz von Modifikatoren kann die Signalintensität verstärken, was insbe-

sondere bei geringen Konzentrationen des Analyten in der Probe ein gewünschter Effekt ist [183, 186, 187]. Als Modifikatoren wurden Ascorbinsäure, Salzsäure und Salpetersäure verwendet, da Welz *et al.* von einem stabilisierenden Effekt der pH-Wert-Reduktion auf Metalllösungen berichteten [159]. Neben den Modifikatoren wurde allen Matrix-Proben eine 1 %-ige Lösung von Triton®-X100 zugesetzt, um die Suspension zu stabilisieren. Bei Triton®-X100 handelt es sich um ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate, das als Detergens verwendet wird, um die Oberflächenspannung herabzusetzen und Proteine zu solubilisieren. Bei den wässrigen Proben entfiel dieser Zusatz.



**Abb. 8-5: Einfluss von verschiedenen Modifikatoren (Ascorbinsäure 10 g/L; Salzsäure 18 % (v/v), Salpetersäure 13 % (v/v)) auf die gemessene Absorption einer Titan-Standardlösung (1500 µg/L) in Wasser und in zwei verschiedenen Matrix-Konzentrationen (c1: 0,55 mg/mL, c2: 1,10 mg/mL). (n = 1)**

Die drei als Modifikatoren verwendeten Säuren übten einen unterschiedlichen Einfluss auf das Absorptionssignal in wässrigen Proben aus (siehe Abb. 8-5). Salzsäure hatte keinen Einfluss auf die Signalintensität, während Ascorbinsäure und Salpeter-

säure die gemessenen Absorptionswerte im Vergleich zum Messwert ohne Zusätze verdreifachten bzw. verdoppelten. In den Matrix-Proben mit niedriger Proteinkonzentration ( $c_1 = 0,55 \text{ mg/mL}$ ) zeigte sich ein negativer Einfluss des Säurezusatzes allgemein in Form einer verminderten Signalintensität. Im Gegensatz dazu waren bei hohen Proteinkonzentrationen ( $c_2 = 1,10 \text{ mg/mL}$ ) positive Effekte zu beobachten. Am stärksten konnte die gemessene Absorption durch den Zusatz von Salpetersäure erhöht werden. Salpetersäure besitzt neben den sauren Eigenschaften zusätzlich eine leicht oxidierende Wirkung, was bei der Salzsäure und Ascorbinsäure nicht der Fall ist. Die mögliche Oxidation der Metalle scheint vorteilhaft im Bezug auf eine effiziente Atomisierung zu sein. Nichtsdestotrotz war der Verstärkungseffekt der Salpetersäure bei der Proteinsuspension nicht so deutlich ausgeprägt wie in den wässrigen Proben. Bei der Verwendung von Ascorbinsäure, die als Antioxidans neben den sauren Eigenschaften auch reduzierende Eigenschaften besitzt, konnte ebenfalls nur eine starke Signalerhöhung in den wässrigen Proben beobachtet werden. Beides könnte ein Hinweis darauf sein, dass die reduzierenden bzw. oxidierenden Eigenschaften der Ascorbin- bzw. Salpetersäure durch Matrixbestandteile ersetzt werden können. In diesen Experimenten wurde zusätzlich der Einfluss der Proteinkonzentration auf die gemessene Absorption deutlich (siehe Abb. 8-5). Bei geringen Proteinkonzentrationen erhöhte sich zunächst der Messwert, wohingegen er bei höheren Proteinkonzentrationen erniedrigt war.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde bei allen weiteren Experimenten in biologischem Material den Proben Salpetersäure als Modifikator zugesetzt. Außerdem wurden zu Kalibrierungszwecken stets Standardlösungen bzw. -suspensionen mit demselben Proteingehalt („*matrix-matched calibration*“) verwendet, um Signalerhöhungen oder -erniedrigungen durch verschiedene Proteinkonzentrationen auszuschließen.

### **8.3 Validierung des Analysenverfahrens**

Ein analytisches Verfahren muss ein verlässliches und reproduzierbares Ergebnis liefern. Die dahingehende Prüfung eines Analyseverfahrens wird als Validierung bezeichnet. Sie stellt die Qualität und Eignung sicher. Es gibt zahlreiche nationale und internationale gesetzliche Regelungen, die genaue Anforderungen an die Validie-

rungsprüfung definieren. Ein Beispiel dafür ist der europäische Leitfaden zur guten Herstellungspraxis (EG-GMP) [188], der die Validierung wie folgt definiert:

*„It is a requirement of GMP that manufacturers identify what validation work is needed to prove control of the critical aspects of their particular operations. Significant changes to the facilities, the equipment and the processes, which may affect the quality of the product, should be validated.”* [189] (dt.: Nach den Prinzipien der Guten Herstellungspraxis (GMP) muss der Arzneimittelhersteller mit Hilfe der Validierung die kritischen Aspekte des Herstellungsprozesses kontrollieren. Er muss die Einrichtungen, die Ausrüstung und die Prozesse, die die Qualität des Arzneimittels beeinflussen können, validieren.)

Für die Validierung einer analytischen Methode wurde im Rahmen der internationalen Harmonisierung im Juni 1995 eine Leitlinie verabschiedet [190]. In dieser Leitlinie sind u.a. die typischen Parameter der Validierung dargelegt. Für die Prüfung der optimierten HR-CS AAS-Methode zur Titanbestimmung wurde kein vollständiges Validierungsverfahren nach den anerkannten gesetzlichen Vorschriften durchgeführt. Es wurden jedoch vier der typischen Validierungsparameter ausgewählt und untersucht (siehe Tab. 8-1):

- die Präzision,
- die Nachweisgrenze,
- die Bestimmungsgrenze,
- und die Empfindlichkeit.

Die Präzision beschreibt die Streuung der Analysenergebnisse. Die Bestimmung erfolgte aus der relativen Standardabweichung einer 12-fachen Injektion einer Probe mit je 200 µg/L und 1000 µg/L Titan-Standardlösung in einer Proteinsuspension ( $c = 1,0 \text{ mg/mL}$ ). Definitionsgemäß handelt es sich bei diesem Verfahren um die Wiederholpräzision. Sie ist ein Maß für die Qualität und Reproduzierbarkeit von Messergebnissen. Die Präzision der optimierten HR-CS AAS-Methode lag je nach Titankonzentration zwischen 4 % und 6 %. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Titanbestimmung ausreichend präzise und reproduzierbar ist.

**Tab. 8-1: Analytische Parameter der optimierten HR-CS AAS-Methode zur Titanbestimmung**

Analytische Parameter	Wert
Präzision (Ti: 200 µg/L) in Proteinsuspension (c = 1,0 mg/mL)	5,8 %
Präzision (Ti: 1000 µg/L) in Proteinsuspension (c = 1,0 mg/mL)	3,9 %
Nachweisgrenze in H <sub>2</sub> O	3,87 µg/L
Bestimmungsgrenze in H <sub>2</sub> O	11,6 µg/L
Nachweisgrenze in Proteinsuspension (c = 1,0 mg/mL)	48,9 µg/L
Bestimmungsgrenze in Proteinsuspension (c = 1,0 mg/mL)	146,2 µg/L
Charakteristische Konzentration	1,43 µg/L

Die Nachweisgrenze (LOD, engl. *limit of detection*) ist definiert als die kleinste nachweisbare (detektierbare) Konzentration. Sie ist zu unterscheiden von der Bestimmungsgrenze (LOQ, engl. *limit of quantification*), bei der es sich um die kleinste quantifizierbare Konzentration handelt. Für dessen Bestimmungen wurde eine Blindprobe (demineralisiertes Wasser) 12-fach injiziert. Mit Hilfe des Mittelwerts ( $x_B$ ) sowie der Standardabweichung ( $\sigma_B$ ) der gemessenen Absorptionen wurde die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze angelehnt an die DIN 32645 wie folgt berechnet (siehe dazu auch 20.2.1):

$$LOD = x_B + 3 \sigma_B ; LOQ = x_B + 9 \sigma_B$$

In wässrigen Proben ist die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze mit 3,87 µg/L bzw. 11,6 µg/L sehr gering. In Proteinsuspensionen wurde, wie aus den Vorexperimenten (siehe 8.2) erwartet, eine höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenze gefunden. Diese Werte lagen mit circa 50 µg/L bzw. 150 µg/L durchaus noch im guten Bereich, was die empfindliche Quantifizierung von Titan auch in biologischem Material ermöglichte.

Ein weiteres Maß für die Empfindlichkeit eines Analyseverfahrens ist die charakteristische Konzentration. Sie ist nach EG-GMP Leitfaden definiert als kleinste detektier-

bare Signaldifferenz. Im Falle der HR-CS AAS ist die charakteristische Konzentration festgelegt als diejenige Konzentration, die einer Absorption von 0,0044 entspricht. Auch dieser Parameter mit einem Wert von 1,43 µg/L bestätigt, dass eine empfindliche Titanbestimmung mit der optimierten Methode möglich war.

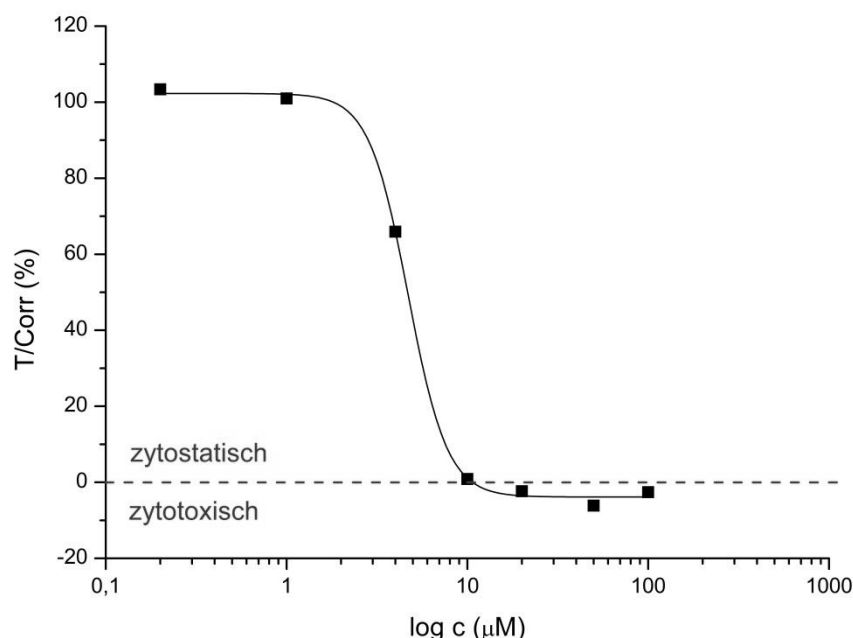
## **8.4 Zusammenfassung**

Es wurde eine HR-CS AAS-basierte Methode zur Bestimmung von Titan in biologischem Material entwickelt, die eine sensitive und reproduzierbare Quantifizierung im unteren µg/L-Bereich ermöglicht. Mit der optimierten Methode konnten auch bekannte Störeffekte von HR-CS AAS-Signalen wie *Memory*-Effekte und das *Tailing* verhindert werden.

Die optimierte Methode beinhaltet ein Temperatur-/Zeitprogramm mit einer Pyrolyse bei 1400 °C und eine Atomisierung bei 2600 °C. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in biologischen Proben der Zusatz von Salpetersäure und Triton®-X100 sinnvoll ist. Darüber hinaus wurde der Einfluss der biologischen Matrix auf die Signalintensität aufgezeigt, was eine Anpassung des Proteingehalts aller Proben auf dieselbe Konzentration vor der Messung erforderlich machte.

## 9. Toxikologische Untersuchungen

Die Untersuchung der antiproliferativen Eigenschaften von neuen potentiellen Arzneistoffen gegenüber Tumorzelllinien ist ein erstes Screening der Substanzen auf die Einsatzmöglichkeit als Antitumorwirkstoff. Bei der Untersuchung der *in vitro*-Toxizität im Zellkulturmodell konnte zwischen einer zytostatischen und zytotoxischen Wirkung unterschieden werden. Das war durch den speziellen Versuchsaufbau (siehe 20.3) und die Verwendung des Farbstoffs Kristallviolett möglich. Kristallviolett kann durch intakte Zellmembranen penetrieren und im Inneren Nukleoproteine anfärben, was es ermöglicht zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Folglich konnte nicht nur bestimmt werden, ob das Wachstum der Tumorzellen durch die Testsubstanz gehemmt wird (zytostatisch, antiproliferativ) sondern auch, ob bestehende Tumorzellen abgetötet wurden (zytotoxisch). In Abb. 9-1 ist der Vergleich zwischen zytostatischen und zytotoxischen Eigenschaften grafisch dargestellt.



**Abb. 9-1: Veranschaulichung zum Vergleich der antiproliferativen Eigenschaften (zytostatisch/zytotoxisch)**

Neben der zytostatischen bzw. zytotoxischen Wirkung in Tumorzellen wurden die neuartigen Titanwirkstoffe auch auf ihre Aktivität gegen Mausfibroblasten untersucht.



Mausfibroblasten dienen als Modell für gesunde menschliche Zellen. Die Ergebnisse liefern Informationen über die Selektivität der Testsubstanzen gegenüber Tumorzellen.

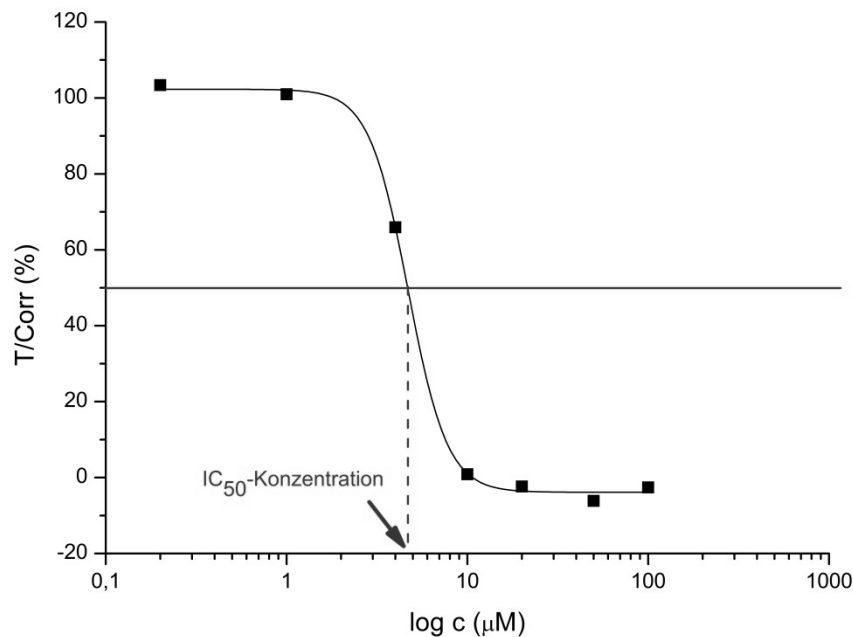
Zur Untersuchung der allgemeinen Toxizität der neuen potentiellen Antitumorwirkstoffe im gesunden Organismus bzw. zur Untersuchung des Einflusses auf die Embryonalentwicklung diente der Zebrafischembryo für ein präklinisches Arzneistoffscreening (siehe 5.2).

Das *in vivo*-Screening in Kombination mit den IC<sub>50</sub>-Werten (siehe 9.1) der Testverbindungen im Zellkulturmodell lieferte erste Hinweise auf unspezifische toxische Effekte der neuen Wirkstoffe.

## **9.1 *In vitro*-Toxizität**

Zur Untersuchung der *in vitro*-Toxizität gegen Tumorzellen wurden MCF-7 Brustkrebszellen und HT-29 Darmkrebszellen verwendet. Brustkrebs (Mammakarzinom) ist die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen in der westlichen Welt. Darmkrebs (Kolorektales Karzinom) ist die zweithäufigste Krebsform bei Männern und Frauen in Deutschland (siehe 1.1). Die aktuelle Therapie erfolgt, wenn möglich, operativ durch Entfernen des Tumorgewebes. Auch eine Chemo- bzw. Strahlentherapie kann zusätzlich oder bei Formen, in denen keine Operation möglich ist, eingesetzt werden. Bei der Chemotherapie kommen verschiedene Antitumorwirkstoffe zum Einsatz. Zur Therapie des Kolorektalen Karzinoms wird in der S3-Leitlinie Oxaliplatin in Kombination mit 5-Fluorouracil/Folinsäure empfohlen. Wenn eine Kontraindikation gegen Oxaliplatin vorliegt, soll auf eine Monotherapie mit Fluoropyrimidinen, Prodrugs des 5-Fluorouracils, zurückgegriffen werden. [191] Die S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms belegt die höchsten Remissionsraten mit einem Taxan (z.B. Paclitaxel) in Kombination mit einem Anthrazyklin (z.B. Doxorubicin) oder Antimetaboliten (z.B. Methotrexat) [192].

Zusätzlich wurden die Effekte der Testsubstanzen auf gesunde Zelllinien untersucht. Dafür wurden Mausfibroblasten (L-929 Zellen) verwendet.



**Abb. 9-2: Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes**

Die *in vitro*-Toxizität der Titankomplexe wurde als IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt. Der IC<sub>50</sub>-Wert (engl. *inhibitory concentration*) ist diejenige Arzneistoffkonzentration, bei der das Zellwachstum der Tumorzellen bzw. Mausfibroblasten um 50 % gehemmt wird. Dazu wurden MCF-7 Zellen, HT-29 Zellen und L-929 Zellen mit 0,1-100 µM der Titankomplexlösungen für 3 bzw. 4 Tage inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die lebenden Zellen wurden nach dessen Fixierung am Plattenboden mit Kristallviolett angefärbt. Durch UV-metrische Vermessung der Farbstoffkonzentrationen und dessen prozentualem Verhältnis zum Kontrollwert konnte die noch vorhandene Biomasse quantifiziert werden. Die um den Kontrollwert korrigierten Prozentwerte wurden dazu gegen den Logarithmus der Substanzkonzentrationen aufgetragen und mit Hilfe der Software Origin einem sigmoidalem Fit (Boltzmann oder Hill 1) unterzogen. An der Kurve konnte die Substanzkonzentration berechnet werden, die eine Reduzierung der Biomasse um 50 % bewirkte (siehe Abb. 9-2). Diese Konzentration entspricht dem IC<sub>50</sub>-Wert. Die detaillierte Versuchsvorschrift ist unter 20.3 beschrieben.

### 9.1.1 Zytotoxizität der Titan-Salan-Komplexe

Die  $IC_{50}$ -Werte der Titan-Salan-Komplexe sind in Tab. 9-1 dargestellt. Der Substituent am aromatischen Ring hatte einen enormen Einfluss auf die Aktivität der Vertreter dieser neuen Substanzklasse. Mit Ausnahme einer Verbindung zeigten alle Titan-Salan-Komplexe eine sehr gute bis gute Aktivität gegen Tumorzellen. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten  $IC_{50}$ -Werten dieser Substanzfamilie in verschiedenen Tumorzellen überein [160, 168–171].

Tab. 9-1:  $IC_{50}$ -Werte der Titan-Salan-Komplexe in Tumorzellen. (MW  $\pm$  Stabw., n = 3-5)

	$IC_{50}$ MCF-7 ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ HT-29 ( $\mu$ M)
$Ti(L^1)(OiPr)_2$	$1,1 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,2$
$Ti(L^2)(OiPr)_2$	$4,4 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
$Ti(L^3)(OiPr)_2$	> 100	> 100
$Ti(L^4)(OiPr)_2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,4$
$Ti(L^5)(OiPr)_2$	$29,7 \pm 7,6$	$29,5 \pm 15,6$
$Ti(L^6)(OiPr)_2$	$1,1 \pm 0,4$	$3,6 \pm 1,7$
$Ti(L^7)(OiPr)_2$	$1,0 \pm 0,3$	$3,4 \pm 1,6$

Im guten Einklang mit vorausgehenden Untersuchungen zeigte  $Ti(L^3)(iOPr)_2$  keine Aktivität in Tumorzelllinien bis zur höchsten Testkonzentration von 100  $\mu$ M [160]. Dieser Komplex wird im Folgenden als inaktiv angesehen. Die aktivsten Komplexe waren die Bromid- und Chlorid-substituierten Komplexe  $Ti(L^1)(iOPr)_2$  und  $Ti(L^4)(iOPr)_2$  mit  $IC_{50}$ -Werten unter 1  $\mu$ M. Das lässt vermuten, dass ein Halogenid in o-Position des Aromaten zu einer höheren antiproliferativen Potenz führt, wohingegen ein Methyl-Substituent nicht gleich vorteilhaft ist. Die Ursache dafür könnte in der höheren hydrolytischen Stabilität der o-substituierten Komplexe liegen [160, 171]. Die beiden Enantiomere  $Ti(L^6)(iOPr)_2$  und  $Ti(L^7)(iOPr)_2$  zeigten eine vergleichbare Aktivität gegen Tumorzelllinien mit einem  $IC_{50}$ -Wert von circa 1  $\mu$ M in MCF-7 Brustkrebszellen und circa 3  $\mu$ M in HT-29 Darmkrebszellen. Eine geringe Antitumoraktivität war für

Ti(L<sup>5</sup>)(iOPr)<sub>2</sub>, bei welchem es sich um ein *o*, *p*-Methyl-substituiertes Trimer handelt, zu beobachten. Die geringe Aktivität lässt sich vermutlich auf die schlechte Wasserlöslichkeit des Komplexes zurückführen, da eine aktuelle Veröffentlichung von Meker *et al.* zeigt, dass die Aktivität dieses Komplexes in einer nanopartikulären Formulierung stark erhöht werden kann [193]. Keine der getesteten Titan-Salan-Komplexe wies eine Selektivität für eine der beiden Tumorzelllinien auf. Eine östrogenabhängige Wirksamkeit kann somit ausgeschlossen werden.

**Tab. 9-2: IC<sub>50</sub>-Werte der Titan-Salan-Komplexe in Mausfibroblasten. (MW ± Stabw., n = 3)**

	IC <sub>50</sub> L-929 (μM)
Ti(L <sup>1</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	1,2 ± 0,7
Ti(L <sup>2</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	2,2 ± 1,1
Ti(L <sup>3</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	> 50
Ti(L <sup>4</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	0,9 ± 0,4
Ti(L <sup>5</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	22,3 ± 0,3
Ti(L <sup>6</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	1,3 ± 0,8
Ti(L <sup>7</sup> )(OiPr) <sub>2</sub>	1,5 ± 0,7

Die antiproliferativen Eigenschaften der Titan-Salan-Komplexe wurden ebenfalls in Mausfibroblasten untersucht und sind in Tab. 9-2 dargestellt. Die Komplexe wiesen in den Mausfibroblasten als Modell für gesunde Zellen, eine vergleichbare Aktivität wie in den Tumorzellen auf. Diese Substanzklasse scheint folglich keine selektive Wirkung auf Tumorzellen zu besitzen. Durch die Unselektivität ist das Risiko für das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen erhöht, was im Hinblick auf den Einsatz dieser Substanzklasse als Antitumorwirkstoff nachteilig ist. Manna *et al.* beobachteten dagegen in ihren Untersuchungen in Mausgeweben eine bioselektive Wirkung der Titan-Salan-Komplexe, was weitere klärende Experimente erforderlich macht [168].

### 9.1.2 Zytotoxizität von Titanocenderivaten

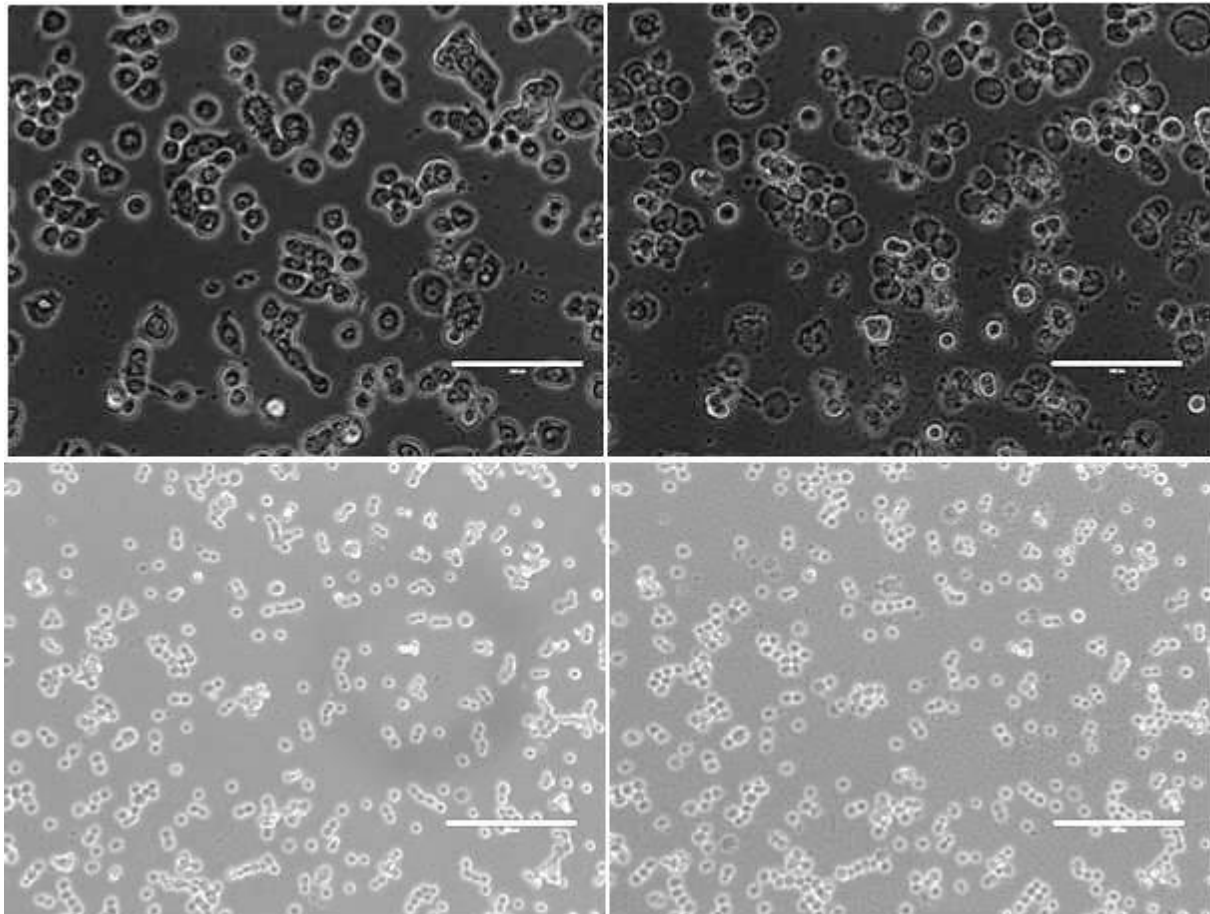
Die  $IC_{50}$ -Werte der Titanocenderivate Titanocendichlorid ( $TiCp_2Cl_2$ ) und Titanocen Y (Ti-Y) wurden in Brust- und Darmkrebszellen sowie in Mausfibroblasten bestimmt (siehe Tab. 9-3). Titanocendichlorid, das sich in den 1990er Jahren in der klinischen Prüfung befand [26–28], zeigte keine zytotoxische Wirkung bis zur höchsten Testkonzentration von 500  $\mu M$  in allen drei Zelllinien. Im Gegenteil dazu lag die anti-proliferative Aktivität des substituierten Titanocenderivates Titanocen Y im unteren mikromolaren Bereich mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 4,1  $\mu M$  in Brustkrebszellen bzw. 5,9  $\mu M$  in Darmkrebszellen und 7,3  $\mu M$  in Mausfibroblasten. Für beide Titanocenderivate konnte in allen drei verwendeten Zelllinien ein ähnlicher  $IC_{50}$ -Wert ermittelt werden, was einer unselektiven Wirksamkeit entspricht.

Tab. 9-3:  $IC_{50}$ -Werte der Titanocenderivate. (MW  $\pm$  Stabw., n = 3-5)

	$IC_{50}$ MCF-7 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ HT-29 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ L-929 ( $\mu M$ )
<b>Ti-Y</b>	4,1 $\pm$ 2,4	5,9 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 2,1
<b><math>TiCp_2Cl_2</math></b>	> 500	> 500	> 500

### 9.1.3 Videomikroskopie

Die DNA und Zellmembranen von Zellen können durch Arzneistoffe geschädigt werden, was sich durch morphologische Änderungen sichtbar machen lässt. In der Tumorthherapie sind diese Veränderungen erwünscht, da sie letztendlich die Tumorzellen absterben lassen, weil der Zellzyklus gestört ist bzw. die Zelle ihre kontrollierte Umgebung nicht mehr aufrechterhalten kann. Die Zellschäden können mit einem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Sie äußern sich als Erstes in einem Anschwellen der Zellen aufgrund von Sauerstoffmangel. Es folgt das Auftreten von kleinen Vakuolen im Zellplasma, bei denen es sich um abgeschnürte Zellfragmenten handelt (vakuoläre Degeneration). Die Zelle kann dann ihre Funktionen nicht mehr aufrechterhalten und es kommt zum programmierten Zelltod, der durch das Zusammenschrumpfen der Zelle, Veränderungen der Zellmembran und den Zerfall in einzelne Fragmente sichtbar wird. [194]



**Abb. 9-3: HT-29 Zellen vor Substanzzugabe (links) und nach 10-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Titankomplex (rechts). (oben:  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , unten: Titanocen Y)**

Die morphologischen Veränderungen von HT-29 Darmkrebszellen nach Inkubation mit den beiden neuartigen Titan(IV)-Komplexen mit Salan- bzw. Cyclopentadienyl-Liganden  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  bzw. Titanocen Y konnten mit einem digitalen Mikroskop, welches eine Videoaufnahmefunktion besitzt, über die Zeit beobachtet werden.

Die Zellen wurden dazu mit einer Testkonzentration nahe dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Titankomplexe (10  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 14 Stunden inkubiert und die Veränderungen der Biomasse wurden aufgezeichnet. Es wurde ebenfalls eine Kontrollmessung (Darmkrebszellen ohne Substanzzugabe) durchgeführt. Über die Videofunktion konnten die morphologischen Veränderungen in einer Zeitrafferdarstellung anschließend sichtbar gemacht werden (detaillierte Versuchsbeschreibung siehe 20.5). In Abb. 9-3 sind die Zellen zu Beginn der Substanzzugabe und nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden zu sehen. Man erkennt deutlich eine Veränderung in der Zellmorphologie nach Einwirken des Titan-Salan-Komplexes  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  (siehe Abb. 9-3 oben). Über die Zeit war ein Anschwellen, Abrunden und Platzen der Zellen unter

Exkretion von Zellbestandteilen zu beobachten. Für den Titankomplex Titanocen Y waren keine Änderungen im Aussehen der Zellen über eine 10-stündige Inkubationsdauer wahrnehmbar, was für später einsetzende toxische Effekte spricht.

#### **9.1.4 Zusammenfassung**

Die untersuchten Titankomplexe zeigten eine unterschiedliche Wirkung auf Tumorzellen. Der bereits in der klinische Prüfung getestete Arzneistoff Titanocendichlorid, der als Referenz mit untersucht wurde, zeigte keine Antitumorwirksamkeit bis zu einer Testkonzentration von 500  $\mu\text{M}$ . Wohingegen die neuartigen Titan(IV)-Komplexe Titanocen Y und die Vertreter der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe eine höhere antiproliferative Aktivität mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten im unteren mikromolaren Bereich aufwiesen (siehe Abb. 9-4). Ähnliche Aktivitäten wie in den Tumorzellen wurden auch in gesunden Zelllinien beobachtet, was für eine unselektive Wirksamkeit der getesteten Titankomplexe spricht. Mit Hilfe eines digitalen Videomikroskops konnten morphologische Veränderungen von Tumorzellen während der Inkubation mit den Titankomplexen beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte der Titan-Salan-Komplex morphologische Veränderungen (Abrunden der Zellen und der Exkretion von Zellinhalt) nach 10-stündiger Inkubationsdauer. Für das Titanocenderivat Titanocen Y konnten keine Veränderungen der Biomasse beobachtet werden.

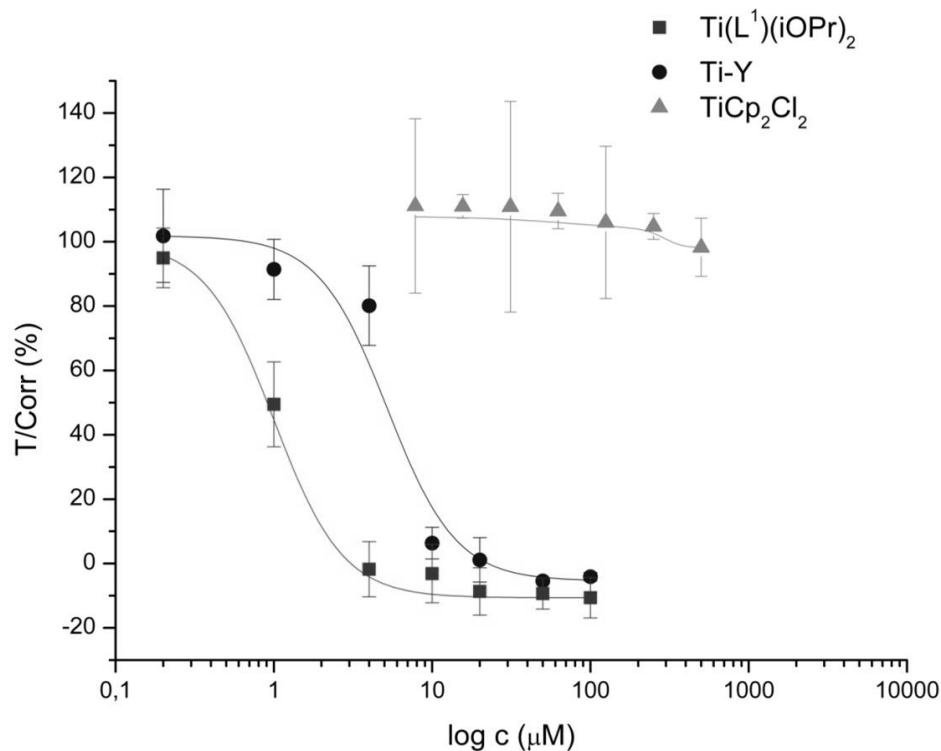
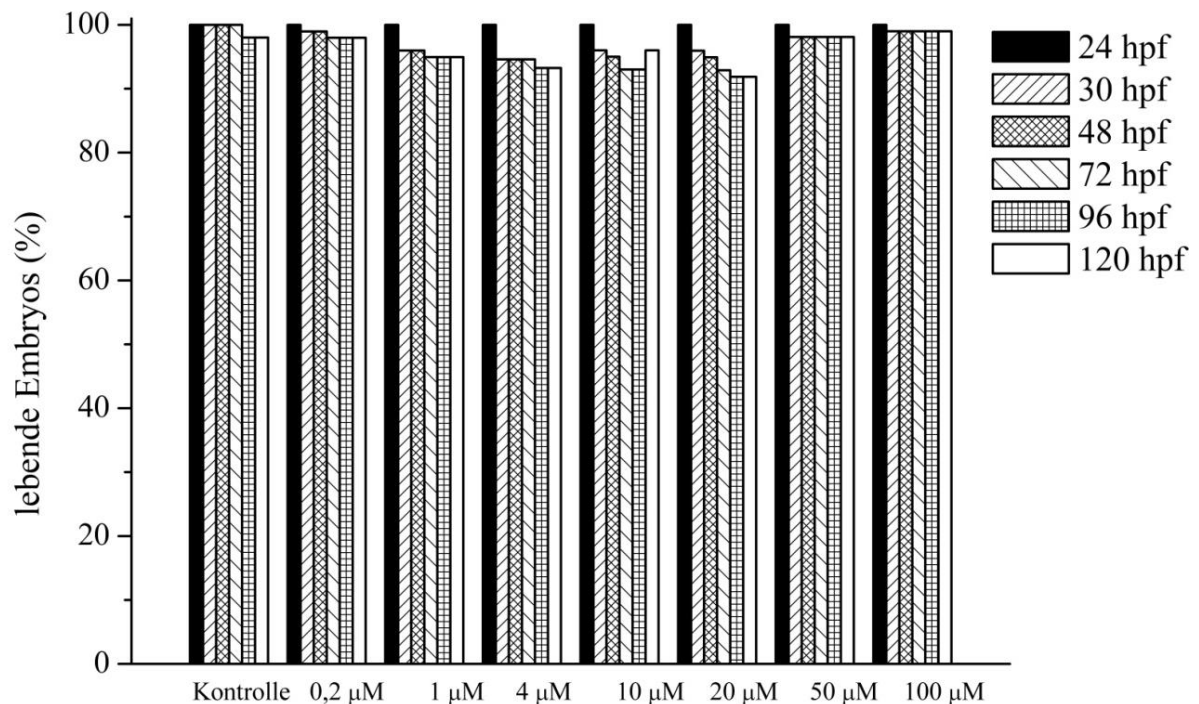


Abb. 9-4: Dosis-Wirkungskurve der Titankomplexe in HT-29 Zellen. (MW  $\pm$  Stabw., n = 2-4)

## 9.2 *In vivo*-Toxizität im Zebrafischembryo

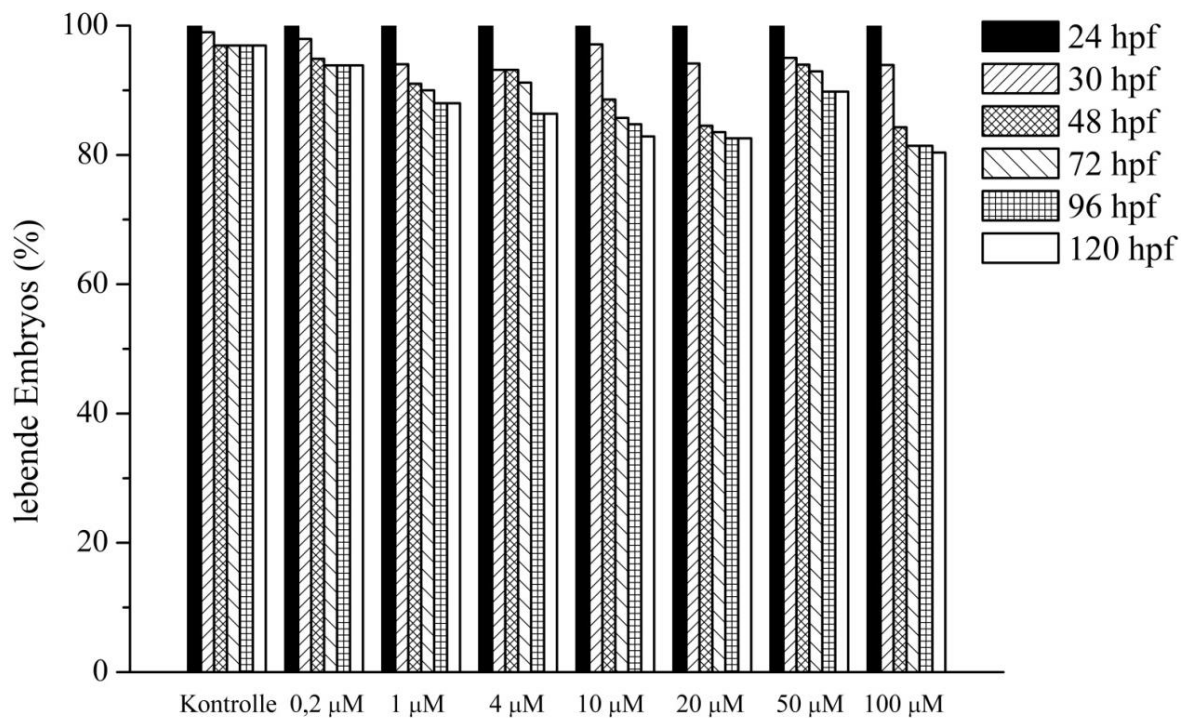
Der Zebrafisch hat sich in den letzten Jahren als ein Modellorganismus für ein erstes Screening neuer potentieller Arzneistoffe im lebenden Organismus etabliert. Er besitzt eine schnelle und transparente embryonale Entwicklung, weshalb er sich für diesen Zweck sehr gut eignet. Bereits einen Tag nach der Befruchtung der Eizelle (24 hpf = Stunden nach der Befruchtung, engl. *hours post fertilization*) ist der Embryo komplett entwickelt. Durch die extramaterale und transparente Entwicklung des Embryos können das Herz, der Blutfluss und andere Organe des Zebrafischembryos mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet werden. So ist es möglich, die Zebrafischembryos auf toxische Effekte und/oder Fehlbildungen zeitsparend zu untersuchen (siehe Kapitel 5). Die *in vivo*-Toxizität im Zebrafischembryo ist eine dem *in vivo*-Experiment in der Maus vorausgehende Untersuchung zur generalisierten Toxizität im lebenden Organismus. Für das Experiment wurden zunächst die Zebrafische verpaart und anschließend wurden die Zebrafischeier isoliert.





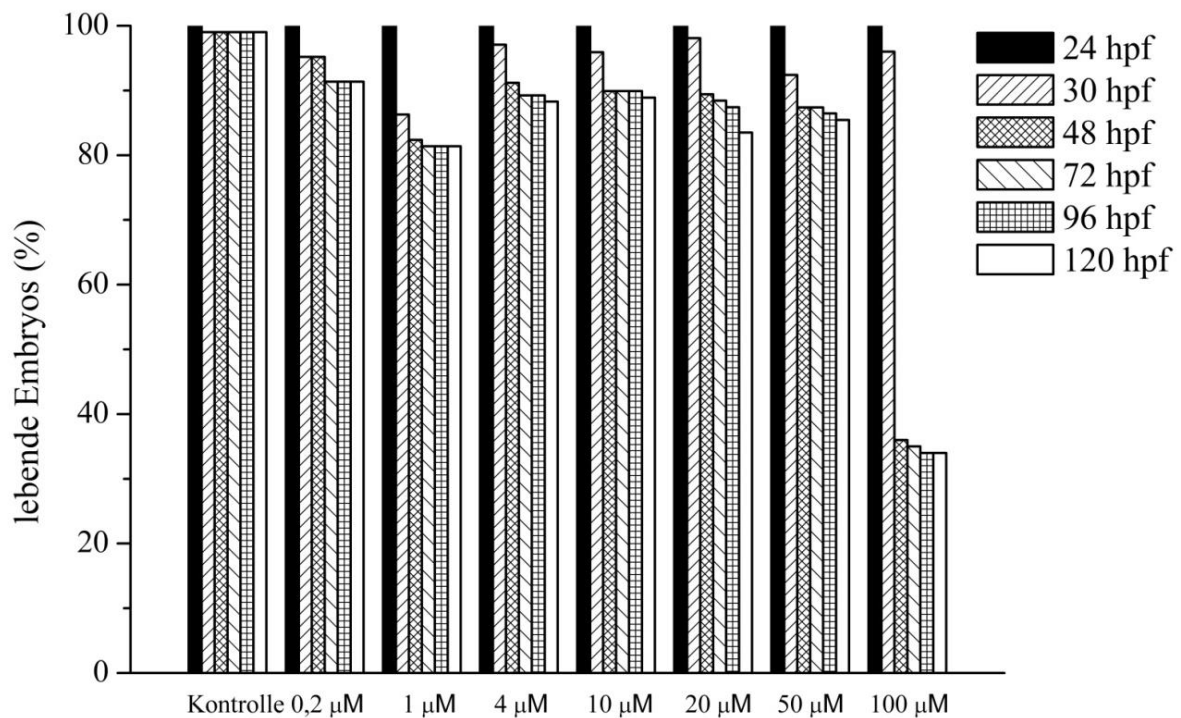
**Abb. 9-5:** *In vivo*-Toxizität von 0,2-100 µM Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{OiPr})_2$  in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, n = 2)

Der Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{OiPr})_2$  zeigte minimal toxische Effekte im Zebrafischembryo (siehe Abb. 9-5). Über 90 % der Zebrafischembryos überlebten eine bis zu 5-tägige Inkubation mit bis zu 100 µM des Komplexes. Eine konzentrationsabhängige Toxizität konnte beobachtet werden, die in einem Minimum an überlebenden Embryos bei einer Konzentration von 20 µM resultierte. Die Überlebensrate von nahezu 100 % bei höheren Konzentrationen (50 µM und 100 µM) des Titankomplexes sind vermutlich auf die nicht vollständige Löslichkeit im Danieau-Medium (Zusammensetzung unter 19.2) bei diesen Konzentrationen zurückzuführen. Erste toxische Effekte traten frühestens nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden auf.



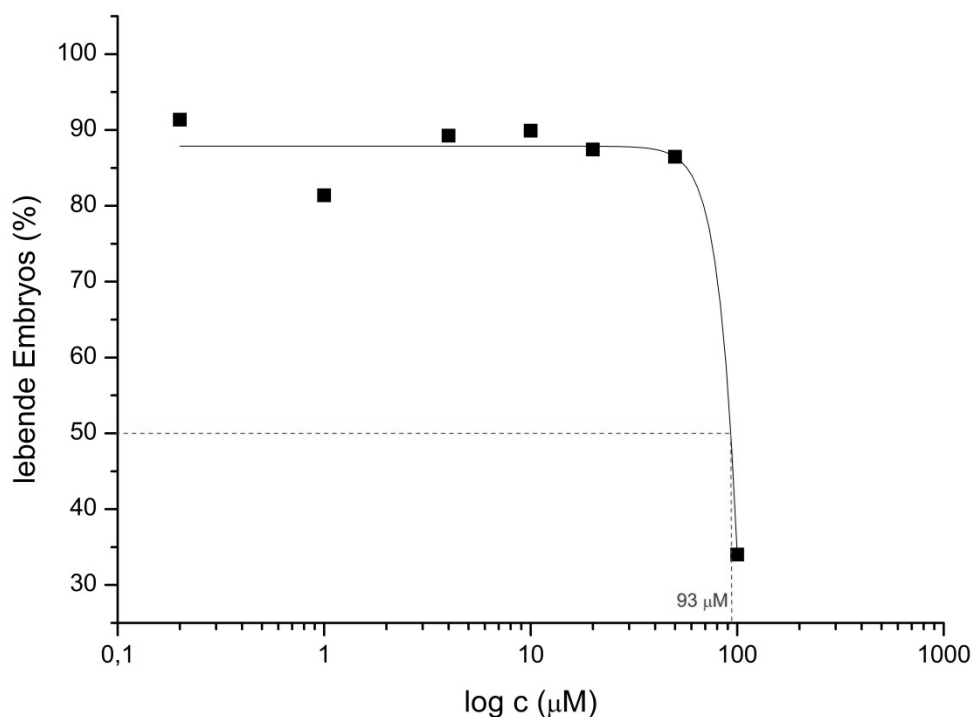
**Abb. 9-6: *In vivo*-Toxizität von 0,2-100 µM Titanocen Y in 24-120 hpf Zebrafischembryos.**  
(MW, n = 2)

Die Abb. 9-6 zeigt, dass auch das Titanocenderivat Titanocen Y keine starken toxischen Effekte im Zebrafischembryo hervorruft. Über 80 % der Embryos überlebten eine 5-tägige Inkubation mit einer 100 mikromolaren Komplexlösung. Verglichen mit dem Titan-Salan-Komplex ist jedoch von einem größeren Einfluss auf die embryonale Entwicklung auszugehen. Auffällig war auch, dass erste toxische Effekte bereits nach einer 6-stündigen Inkubationsdauer bei Inkubation mit 100 µM beobachtet werden konnten.



**Abb. 9-7: *In vivo*-Toxizität von 0,2-100 µM Titanocendichlorid in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, n = 2)**

Das Titanocenderivat Titanocendichlorid übte den größten Einfluss auf die Entwicklung der Zebrafischembryos aus (siehe Abb. 9-7). Nur 30-35 % der Embryos überlebten die Inkubation mit einer 100 mikromolaren Komplexlösung über den gesamten Testzeitraum von 5 Tagen. Bei niedrigeren Konzentrationen waren die Ergebnisse mit denen des Titanocen Y vergleichbar. Für Titanocendichlorid konnte ein  $LC_{50}$ -Wert aus den erhaltenen experimentellen Daten berechnet werden (siehe Abb. 9-8). Der  $LC_{50}$ -Wert entspricht als halbmaximale letale Konzentration (*in vivo*) dem ermittelten  $IC_{50}$ -Wert in den Tumorzellen (*in vitro*). Mit 93 µM lag dieser deutlich unter dem in Tumorzellen erhaltenen  $IC_{50}$ -Wert von über 500 µM (siehe 9.1.2).



**Abb. 9-8: Dosis-Wirkungskurve von Titanocendichlorid in 96 hpf Zebrafischembryos.**  
(MW, n = 2)

### 9.3 Zusammenfassung

Die neuen Titan(IV)-Komplexe mit Salan- oder Cyclopentadienyl-Liganden zeigten mit wenigen Ausnahmen IC<sub>50</sub>-Werte gegen Brust- und Darmkrebszellen im unteren mikromolaren Bereich und besitzen somit eine höhere antiproliferative Aktivität als die Leitstruktur Titanocendichlorid, die keine Zytotoxizität zeigte. Die Aktivität der Titan Komplexe in Mausfibroblasten, die ein Modell für gesunde menschliche Zellen sind, war vergleichbar. Das macht eine unselektive Wirkung wahrscheinlich. Die LC<sub>50</sub>-Werte der neuen Titan(IV)-Komplexe im Zebrafischembryo lagen deutlich höher als die IC<sub>50</sub>-Werte in Tumorzellen. Im Gegensatz dazu zeigte der Komplex Titanocendichlorid eine Toxizität im Zebrafischembryo (LC<sub>50</sub> = 93 μM nach 72 Stunden), jedoch keine zytotoxischen Eigenschaften in Tumorzellen (IC<sub>50</sub> > 500 μM nach 72 Stunden). Da es sich bei den *in vivo*-Experiment im Zebrafischembryo nur um ein erstes Screening handelt und dieses nicht mit den *in vivo*-Experimenten in der Maus vergleichbar ist, liefern die Ergebnisse nur einen Hinweis darauf, dass der Titan-Salan-Komplex Ti(L<sup>1</sup>)(OiPr)<sub>2</sub> und Titanocen Y eine vergleichsweise geringe Toxizität

im Gesamtorganismus besitzen, obwohl sie antiproliferativ gegen Tumorzellen wirken. Dennoch stehen die Ergebnisse im Einklang mit Berichten über toxikologische Untersuchungen des Titanocen Y in xenotransplantierten Mäusen, die von einem moderaten Gewichtsverlust der Mäuse, aber keinen weiteren Nebenwirkungen sprechen [32–36]. Für die Titan-Salan-Komplexe wurde ebenfalls eine gute Verträglichkeit in der Maus belegt werden [195, 196].

## 10. Bindungsaffinität zu Biomolekülen

Die Bindungsaffinität von potentiellen Arzneistoffen zu Biomolekülen konnte mit einer bereits publizierten Ethanolpräzipitationsmethode bestimmt werden [197, 198]. Als Biomolekül ist bei metallbasierten Wirkstoffen besonders die DNA interessant, da es für die auf dem Markt zugelassenen Platinkomplexe als Target identifiziert wurde [64]. Das Bindevermögen der Platinkomplexe an das DNA-Molekül ist für die Wirksamkeit dieser Substanzklasse relevant und definiert den Wirkmechanismus. Mit Hilfe von Bindungsexperimenten sollte untersucht werden, ob Titanokomplexe auf ähnliche Art mit Biomolekülen interagieren und die DNA ebenfalls als Target für Titanokomplexe in Betracht kommt. Für Titanocendichlorid wurde in den 1980er und 1990er Jahren bereits ein ähnlicher auf der Interaktion mit DNA-basierender Wirkmechanismus vermutet [199, 200] und es wurden einige DNA-Bindungsexperimente zu Titanocendichlorid und anderen Titanocenderivaten publiziert [68, 69].

Ein weiteres Biomolekül, welches eine Rolle beim Arzneistofftransport und der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen spielt, ist das Serumalbumin. Durch eine hohe Bindungsaffinität von Arzneistoffen (> 90 %) zum Serumalbumin reduziert sich der frei vorliegende, für die Wirksamkeit relevanten Wirkstoffanteil. Eine zu geringe Affinität ist ebenfalls unerwünscht, da die Bindung an Plasmaproteine die Löslichkeit von Arzneistoffen erhöhen kann, was wiederum die Bioverfügbarkeit erhöht. Zusätzlich wird Albumin als Transporter diskutiert. Für das Plasmaprotein Transferrin und dessen Rolle im Transport von metallbasierten Wirkstoffen sind in der Literatur bereits einige Publikationen in der Literatur zu finden [201]. Deshalb sollte auch für die neuen Titan(IV)-Komplexe die Affinität zum Serumalbumin näher untersucht werden. Für Titanocendichlorid sind von Tinoco *et al.* Vermutungen über den Transport mittels Plasmaproteine zur Zelle veröffentlicht worden (siehe Abb. 10-1) [202]. Sie fanden zudem heraus, dass Serumalbumin an den Titanocen-Liganden bindet, was eine bessere Löslichkeit und Hydrolysestabilität bei physiologischem pH-Wert bedeutet. Gao *et al.* und Guo *et al.* publizierten Anfang des 20. Jahrhunderts Untersuchungen zum Transport von Titanocendichlorid mittels Transferrin [203, 204]. Die Rolle des Albumins als Transporter stützt außerdem die von Hogan *et al.* aufgestellte Theorie, dass Titanocenderivate über passive Diffusion in die Zelle gelangen [205]. Für die

Experimente wurde neben den neuen Titan(IV)-Komplexen das Titanocendichlorid als Referenz mit untersucht.

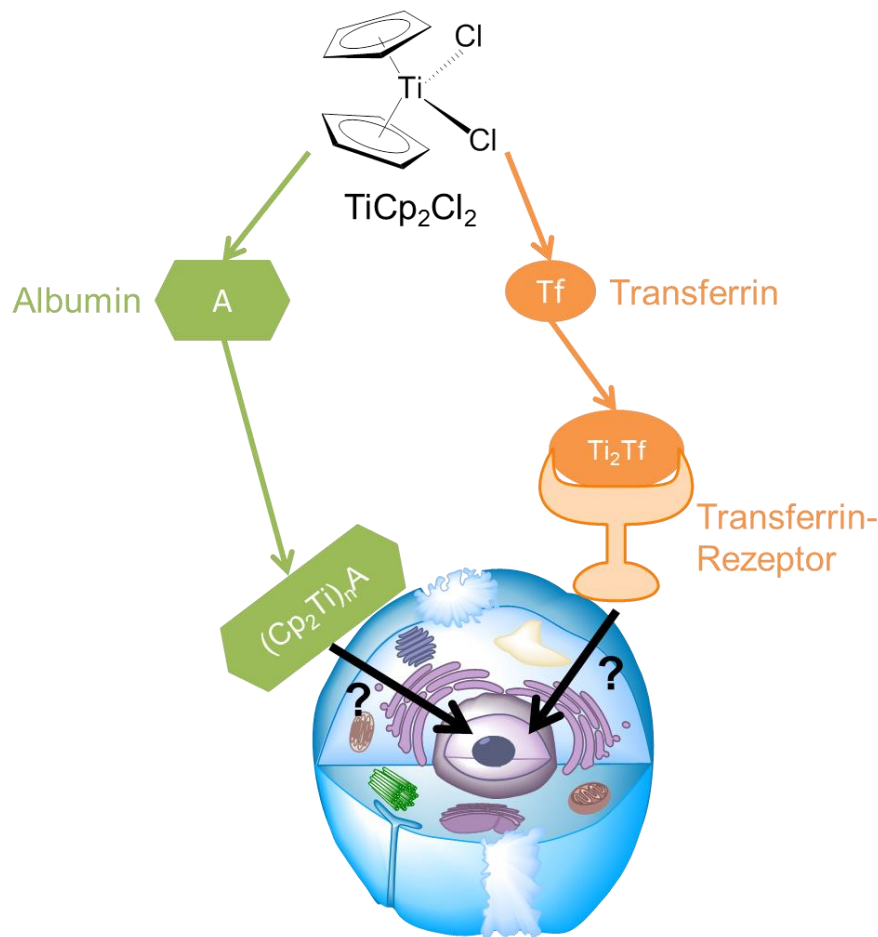
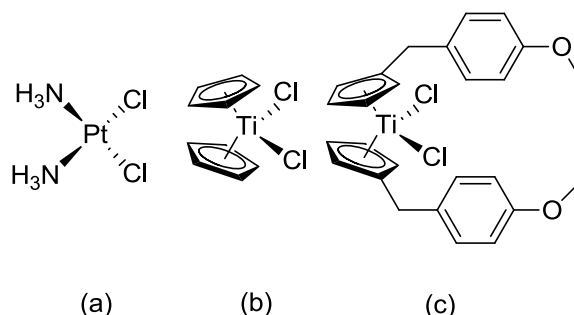


Abb. 10-1: Mechanismus des Albumin (A)- und Transferrin (Tf)-basierten Transports von Titanocendichlorid ( $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ )

## 10.1 DNA-Bindung

Die DNA ist ein bekanntes Target für Metallkomplexe in der Tumorthherapie (siehe 4.1.2). Mit Hilfe eines einfachen Bindungsexperiments an isolierter Lachsspermien-DNA wurde die Bindungsaffinität der Titankomplexe zur DNA untersucht. So wurde ein erster Hinweis darauf erhalten, ob die DNA als mögliches Target für Titankomplexe in Betracht kommt. Auch wenn der Wirkmechanismus für Titanocendichlorid immer noch unklar ist, wurde schon oft von der DNA als intrazelluläres Target berichtet [68, 199, 206]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Titanocenderivate Titanocendichlorid und Titanocen Y zum Zytostatikum Cisplatin (siehe Abb. 10-2) kommt ebenfalls der Bindungsmodus der kovalenten Bindung (siehe 4.1.2.1) in

Betracht. Guo *et al.* berichteten von unterschiedlichen Bindestellen in der DNA [16]. Cisplatin bindet bevorzugt an den Stickstoff der Nukleobasen, wohingegen für Titanocendichlorid eine Bindung zur Phosphatgruppe der Nukleotide mittels NMR- und IR-Spektrometrie gefunden wurde.



**Abb. 10-2: Strukturelle Ähnlichkeit der Titanocenderivate zu Cisplatin: (a) Cisplatin, (b) Titanocendichlorid, (c) Titanocen Y**

Für das Bindungsexperiment wurde eine definierte Menge DNA mit 50  $\mu\text{M}$  der drei Titan-Komplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , Titanocen Y und Titanocendichlorid über 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt. Da nicht von einer quantitativen Fällung ausgegangen werden kann, wurde die ausgefällte DNA mittels UV-Messungen quantifiziert. Das ist möglich, da die DNA bei 260 nm ein UV-Maximum aufweist (siehe Abb. 10-3). Zusätzlich wurde die Titankonzentration in den Proben quantifiziert. Dazu wurde die optimierte HR-CS AAS-Methode verwendet (siehe Kapitel 8). Abschließend konnten beide Konzentrationen ins Verhältnis gesetzt werden, was ein Parameter für die Affinität des Titankomplexes zur DNA darstellt. Außerdem wurde das Nukleosid/Substanz-Verhältnis berechnet. Diese Methode erfasste im Wesentlichen die kovalenten Bindungen zur DNA. Die genaue Versuchsvorschrift ist unter 20.6.1 zu finden.



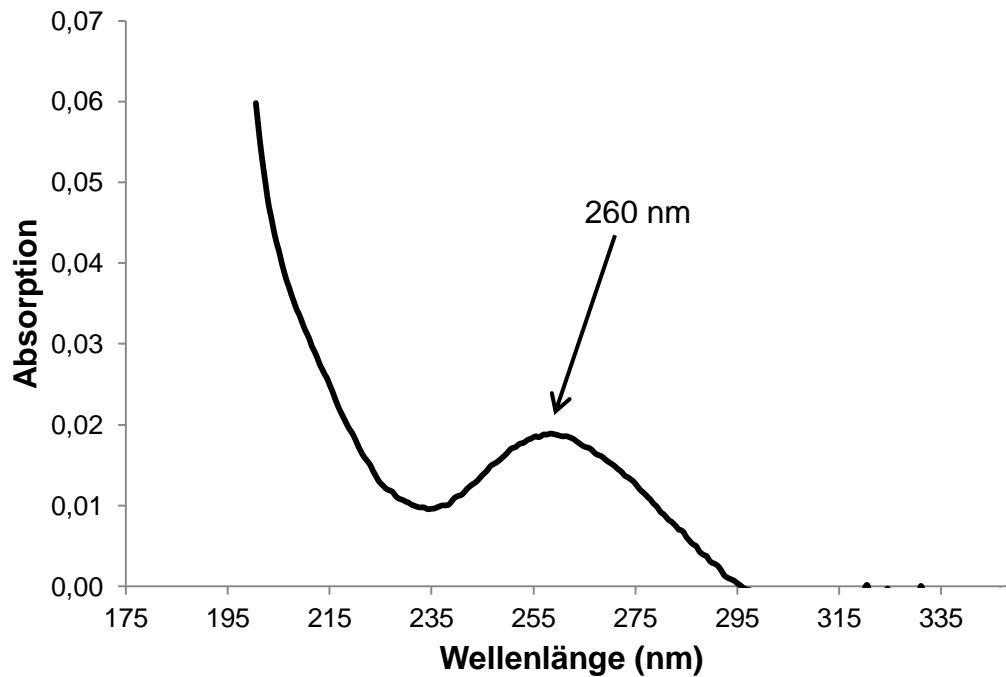


Abb. 10-3: UV-Spektren verschiedener DNA-Konzentrationen von 175-350 nm

Die Ergebnisse des DNA-Bindungsexperiments sind in Abb. 10-4 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die beiden Titanocenderivate Titanocen Y und Titanocendichlorid haben mit circa 300 pmol Titan, das pro  $\mu\text{g}$  DNA gebunden ist, eine wesentlich höhere Affinität zur DNA als der Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , bei welchem etwa 15 pmol Titan pro  $\mu\text{g}$  DNA gebunden sind.

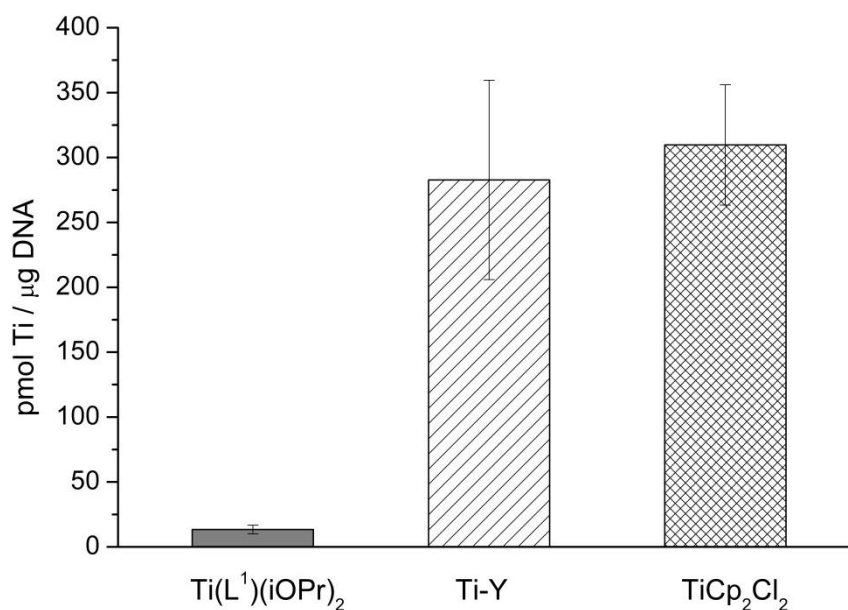


Abb. 10-4: Affinität der Titankomplexe zur DNA nach 4-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C (Ti-Y: Titanocen Y,  $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ : Titanocendichlorid). (MW  $\pm$  Stabw., n = 4)

Zusätzlich wurde das Nukleosid/Substanz-Verhältnis berechnet. Je kleiner dieses ist, desto höher ist die Bindung des Moleküls zur DNA. Zum Vergleich wurden in der Literatur Affinitätswerte von Cisplatin und Carboplatin unter ähnlichen Versuchsbedingungen gefunden. Diese liegen mit einem Nukleosid/Substanz-Verhältnis von über 3000 wesentlich höher als die untersuchten Titankomplexe (siehe Tab. 10-1). [198] Insgesamt zeigten alle Titankomplexe eine hohe Tendenz an die DNA zu binden (Nukleosid/Substanz-Verhältnis < 300).

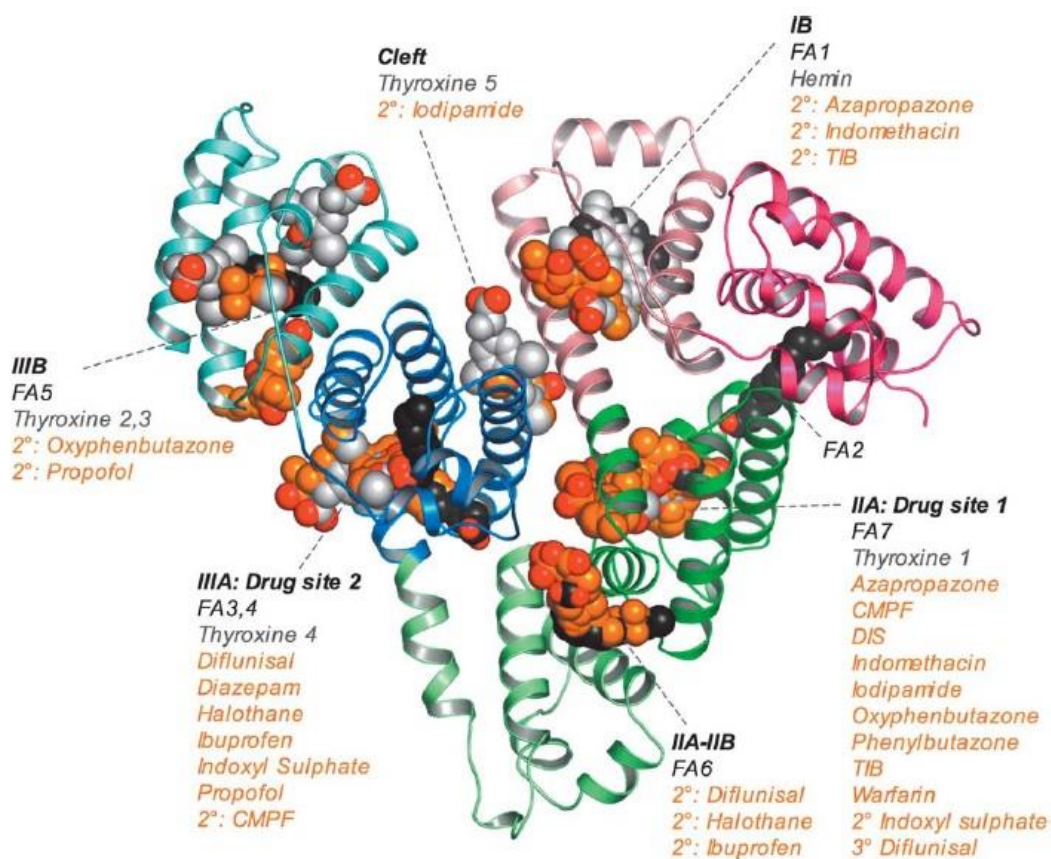
Tab. 10-1: DNA-Bindung von Metallkomplexen. (MW  $\pm$  Stabw., n = 4)

Substanz	Ti/DNA (pmol/ $\mu$ g)	Nukleosid/Substanz-Verhältnis
<b>Cisplatin</b>	-	> 3000 [198]
<b>Carboplatin</b>	-	> 3000 [198]
<b>Ti(L<sup>1</sup>)(iOPr)<sub>2</sub></b>	13,34 $\pm$ 3,34	255,77 $\pm$ 73,98
<b>Titanocen Y</b>	282,69 $\pm$ 76,79	12,14 $\pm$ 3,62
<b>Titanocendichlorid</b>	309,70 $\pm$ 46,30	10,64 $\pm$ 1,53

Für Titanocendichlorid wurde schon zuvor von einer hohen DNA-Bindung mit Bindungskonstanten um  $10^5$  berichtet [21]. Auch eine spektrometrische Studie mit induktiv gekoppeltem Plasma bestätigte eine starke und stabile Bindung dieses Komplexes zur DNA [207]. Das Ausmaß der DNA-Bindung korrelierte jedoch nicht mit der Zytotoxizität der Titankomplexe (siehe 9.1). Der Titan-Salan-Komplex Ti(L<sup>1</sup>)(iOPr)<sub>2</sub> besitzt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von etwa 1  $\mu$ M in HT-29 Zellen die höchste Zytotoxizität der drei untersuchten Titankomplexe, mit einem Nukleosid/Substanz-Verhältnis von circa 250 jedoch die geringste Affinität zur DNA. Die beiden Titanocenderivate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zur DNA nicht. Der Unterschied in den IC<sub>50</sub>-Werte (HT-29 Zellen) ist mit 4  $\mu$ M (Titanocen Y) im Vergleich zu über 500  $\mu$ M (Titanocendichlorid) dagegen groß. Es ist folglich anzunehmen, dass die DNA nicht das alleinige Target der untersuchten Titankomplexe ist.

## 10.2 Bindung an Serumalbumin

Das menschliche Blutplasma besteht zu 60 % aus Albumin. Es ist für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und für den Transport wasserunlöslicher Stoffe, z.B. Fettsäuren, verantwortlich. Die Molekülmasse von Serumalbumin beträgt 65 kDa [208]. Eine Besonderheit des Albumins ist der hohe Anteil der Aminosäure Cystein, weshalb Albumin einen hohen Schwefelgehalt aufweist. Serumalbumin besitzt 17 Disulfid-Brücken, die wesentlich zur Reaktivität beitragen [209]. Neben dem humanen Albumin kommt Albumin auch in anderen Säugetieren vor. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit und strukturellen Verwandtschaft zum humanen Serumalbumin wurde für die Experimente Rinderserumalbumin verwendet. Der zweitgrößte Bestandteil des menschlichen Plasmas sind die Globuline, die sich in  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline einteilen lassen.



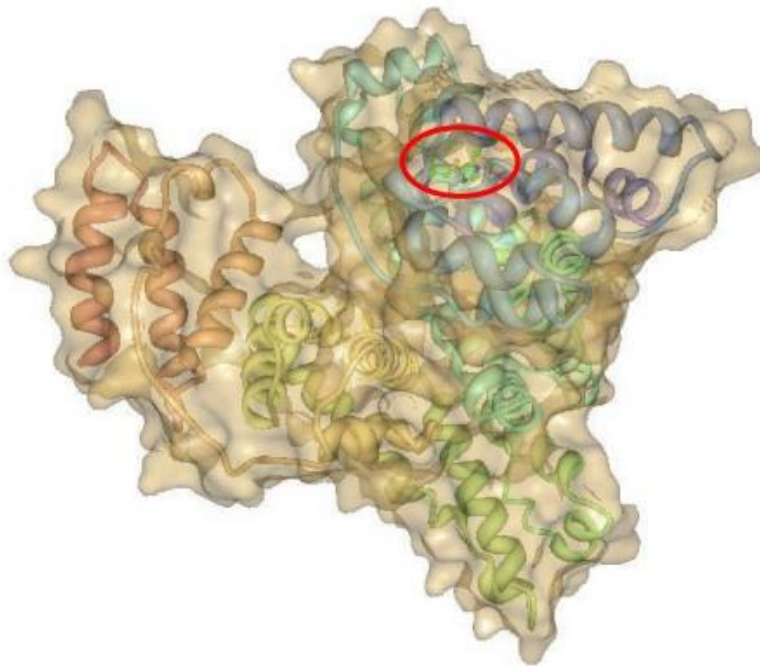
**Abb. 10-5: Struktur des humanen Serumalbumins mit drei unterschiedlichen Domänen und den Ligandenbindungsstellen. Die Sekundärstruktur ist in verschiedenen Farben dargestellt. [210]**

Die Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen ist ein wichtiger pharmakologischer Parameter, da durch die Bindung an Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, weniger freie

Wirkstoffmoleküle im Blutplasma vorliegen und es zu einer Wirkverzögerung oder verminderten Wirksamkeit kommen kann. Je kleiner die Plasmaproteinbindung einer Substanz ist, desto mehr Substanzmenge steht im Zielgewebe zur Verfügung. Somit hat die Affinität von Arzneistoffen zu Albumin einen starken Einfluss auf den pharmakokinetischen Parameter der Bioverfügbarkeit (siehe 3.2). Die Plasmaproteinbindung ist insbesondere dann ein wichtiger Parameter, wenn mehr als 90 % des Arzneistoffes gebunden vorliegen. Die Proteinbindung kann durch Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Im Albumin gibt es verschiedene Akzeptorareale, die für Arzneistoffe eine Rolle spielen (siehe Abb. 10-5). Die Bindungsstellen des Albumins sind sehr hydrophobe Regionen und wurden in den Subdomänen I und II identifiziert. Bei der Hauptbindestelle handelt es sich um die Aminosäure Cys-34, die von einem proximalen Lysin und vicinalen Histidin (His-39) umgeben ist. Durch die basische Umgebung des Cys-34 wird der  $pK_s$ -Wert der enthaltenen Thiolstruktur von normalerweise 8-9 auf circa 5 herabgesetzt und liegt damit im Bereich des Selenocysteins (siehe 4.2). [211] Die genannten Eigenschaften der Cys-34-His-39-Konfiguration des Serumalbumins sind günstig für die Bindung von Metallen und Metallwirkstoffen (siehe Abb. 10-6).

In einer Albuminbindungsstudie wurde die Affinität der Titankomplexe zu Rinderserumalbumin untersucht. Dabei wurde auf eine bereits publizierte Ethanolpräzipitationsmethode zurückgegriffen [197]. Die genaue Versuchsdurchführung des Bindungsexperiments ist unter 20.7 beschrieben. Für das Experiment wurde Rinderserumalbumin aufgrund der besseren Verfügbarkeit und engen Verwandtschaft zum humanen Serumalbumin verwendet. Eine Albuminkonzentration von 40 mg/mL wurde mit den drei Titankomplexen  $Ti(L^1)(OiPr)_2$ , Titanocen Y und Titanocendichlorid (jeweils 50  $\mu M$ ) über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot aus der Probenlösung genommen und die enthaltenen Proteine quantitativ mit Ethanol gefällt. Unter Annahme, dass das Albumin vollständig gefällt wird, konnte durch Titanbestimmung mittels HR-CS AAS (siehe 20.2.2) der Anteil des Titankomplexes, welcher an das Albumin gebunden vorliegt, in Prozent berechnet werden.

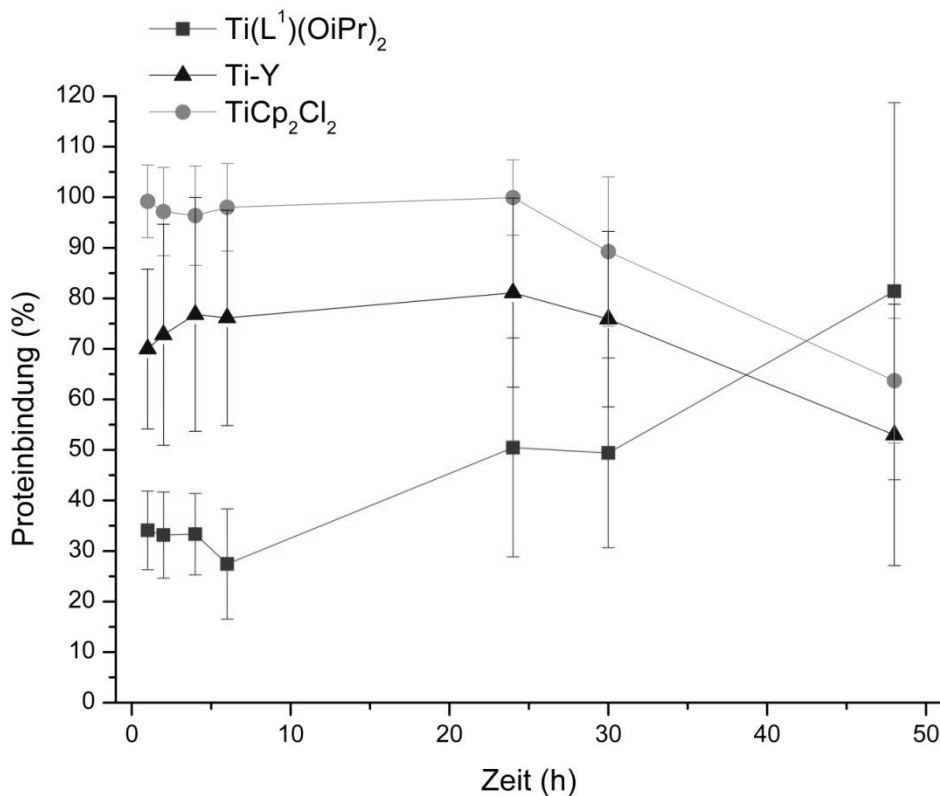
In Abb. 10-7 sind die Ergebnisse des Bindungsexperiments graphisch dargestellt. Der Titan-Salan-Komplex  $Ti(L^1)(OiPr)_2$  zeigte über die ersten 6 Stunden mit einer



**Abb. 10-6: Albumin-Domäne mit der Cys-34-His-39-Konfiguration als mögliche Bindestelle für Metallwirkstoffe (rot eingekreist) [212]**

Proteinbindung von circa 35 % eine nur geringe Bindung an das Albumin. Die beiden Titanocenderivate Titanocen Y und Titanocendichlorid wiesen eine wesentlich höhere Affinität zum Rinderserumalbumin auf. Im Fall des Titanocendichlorid lagen nahezu 100 % an das Protein gebunden vor. Titanocen Y zeigte eine Proteinbindung von circa 75 %. Über die ersten 24 Stunden des Experiments blieben diese Werte stabil. Danach folgte ein Abfall, so dass nach 48 Stunden nur noch 50 % (Ti-Y) bzw. 65 % ( $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ ) an das Protein gebunden vorlagen. Aktuell wurde von Tacke *et al.* in Titrationsexperimenten ebenfalls von einer starken Bindung des Titanocen Y zu Albumin berichtet [213].

Interessant ist, dass für den Titan-Salan-Komplex die Proteinbindung mit der Zeit anstieg. Nach 48 Stunden waren über 80 % des Titan-Salan-Komplexes an das Albumin gebunden. An dieser Stelle soll auf die hohen Standardabweichungen nach längeren Inkubationszeiten (> 24 Stunden) hingewiesen werden. Durch die sich überschneidenden Konfidenzintervalle (siehe Abb. 10-7) lässt sich keine absolute Aussage zur Proteinbindung bei längerer Inkubation (> 24 Stunden) treffen. Vermutlich spielen hier Zersetzungsprodukte der Titankomplexe eine Rolle.



**Abb. 10-7: Proteinbindung der Titankomplexe (Ti(L¹)(iOPr)₂: Titan-Salan, Ti-Y: Titanocen Y, TiCp₂Cl₂: Titanocendichlorid). (MW ± Stabw., n = 4)**

Die Analyse der Kinetik der Proteinbindung gestaltet sich schwierig. Beim Titanocendichlorid ist das Protein schon nach kurzer Zeit gesättigt, da nahezu 100 % des Titankomplexes an das Protein gebunden vorliegen. Beim Titanocen Y spricht der Kurvenverlauf auch für eine Sättigungskinetik, wobei das Enzym nie zu 100 % gesättigt ist. Im Fall des Titan-Salan-Komplexes liegt die Proteinbindung in den ersten 6 Inkubationsstunden konstant bei 30-40 %. Nach 6 Stunden erfolgt ein nahezu linearer Anstieg.

Die Ergebnisse zeigen, dass die drei untersuchten Titankomplexe eine unterschiedliche Affinität zu Albumin, dem Hauptbestandteil des menschlichen Plasmas, aufweisen. Die Titanocenderivate, die sich strukturell sehr ähnlich sind, zeigen beide eine hohe Proteinbindung, wohingegen der Titankomplex mit Salan-Ligand eine nur geringe Affinität zum Albumin besitzt. Für die Bioverfügbarkeit könnte die geringe Albuminbindung von Vorteil sein, da mehr freier Wirkstoff zur Verfügung steht. Der geringere IC<sub>50</sub>-Wert in Tumorzellen des Titan-Salan-Komplexes könnte ein weiteres Indiz dafür sein. Die Hypothese sollte jedoch durch weitere Experimente bestätigt

werden. Aus diesem Grund wurden Zellaufnahmeexperimente (siehe Kapitel 11) durchgeführt, die die Relevanz der Bindungseigenschaften der Titankomplexe näher untersuchen sollten.

### **10.3 Zusammenfassung**

Die Bindungsexperimente zeigten, dass Titankomplexe unterschiedliche Affinitäten zu Biomolekülen aufweisen. Das Titan als Zentralatom spielte eine eher untergeordnete Rolle, wohingegen der Ligand einen großen Einfluss auf die Bindungseigenschaften ausübte. Die Titanocenderivate Titanocendichlorid und Titanocen Y, die sich strukturell sehr ähnlich sind, zeigten ähnliche Affinitäten zur DNA und zum Serumalbumin. Beide lagen bereits nach kurzer Inkubationszeit nahezu vollständig an das Serumalbumin und die DNA gebunden vor, was mit den in der Literatur gefunden Ergebnissen für Titanocendichlorid übereinstimmt [21, 202, 214–216]. Für den Titan-Salan-Komplex wurde ein unterschiedliches Bindungsvermögen mit einer nur geringen Albuminaffinität (nur circa 40 % des Komplexes lagen nach kurzer Inkubationszeit gebunden vor) beobachtet. Zur DNA konnte für den Titan-Salan-Komplex ebenfalls eine geringere Affinität als für die Titanocenderivate gefunden werden.

## 11. Untersuchungen zur Bioverteilung

Nach der Aufnahme des Arzneistoffs in den Blutkreislauf, wird dieser im Körper verteilt und in die Zelle aufgenommen, um an den Wirkort zu gelangen. Die Zellaufnahme eines Arzneistoffs ist somit ein wesentlicher Faktor für die Wirksamkeit. Sie wird stark von der Fähigkeit des Arzneistoffs Biomembranen zu passieren beeinflusst (siehe Kapitel 3). Die quantitative Bestimmung der Zellaufnahme von Arzneistoffen lässt sich mit sehr empfindlichen analytischen Verfahren realisieren. Bei der Quantifizierung von metallbasierten Wirkstoffen in biologischem Material hat sich die Atomabsorptionsspektrometrie bewährt (siehe Kapitel 6). Mit Hilfe der optimierten HR-CS AAS-basierten Methode (siehe Kapitel 8) wurde die Titankonzentration in Tumorzellen nach Inkubation mit Titankomplexen bestimmt. Die Untersuchungen sollten zeigen, ob die unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte der Titankomplexe in Tumorzellen auf unterschiedliche intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen zurückzuführen sind. Dazu wurden HT-29 Zellen mit den Titankomplexen über einen Zeitraum von bis zu 27 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen isoliert, lysiert und die Titankonzentrationen mittels HR-CS AAS quantifiziert. Bei der Auswertung wurde die Titankonzentration auf die Proteinkonzentration der Probe, die zuvor mit der Bradford-Methode zur Proteinbestimmung (siehe 20.8) quantifiziert wurde, bezogen. Unter Berücksichtigung des mittleren Zelldurchmessers konnte zudem die zelluläre Titankonzentration geschätzt werden. Eine detaillierte Versuchsvorschrift ist unter 20.9.1 zu finden.

Mittels eines Bindungsexperiments (siehe 10.2) konnte gezeigt werden, dass die Titankomplexe unterschiedliche Affinitäten zu Serumalbumin aufweisen. Deshalb sollte in zusätzlichen Zellaufnahmeexperimenten der Einfluss des Serumalbumins, dem Hauptbestandteil des fetalen Kalbserums ist, genauer untersucht werden. Fetales Kalbserum wird standardmäßig als Zusatz zum Zellkulturmedium für die Zellaufnahmeexperimente verwendet und enthält hohe Konzentrationen an verschiedenen Serumproteinen.

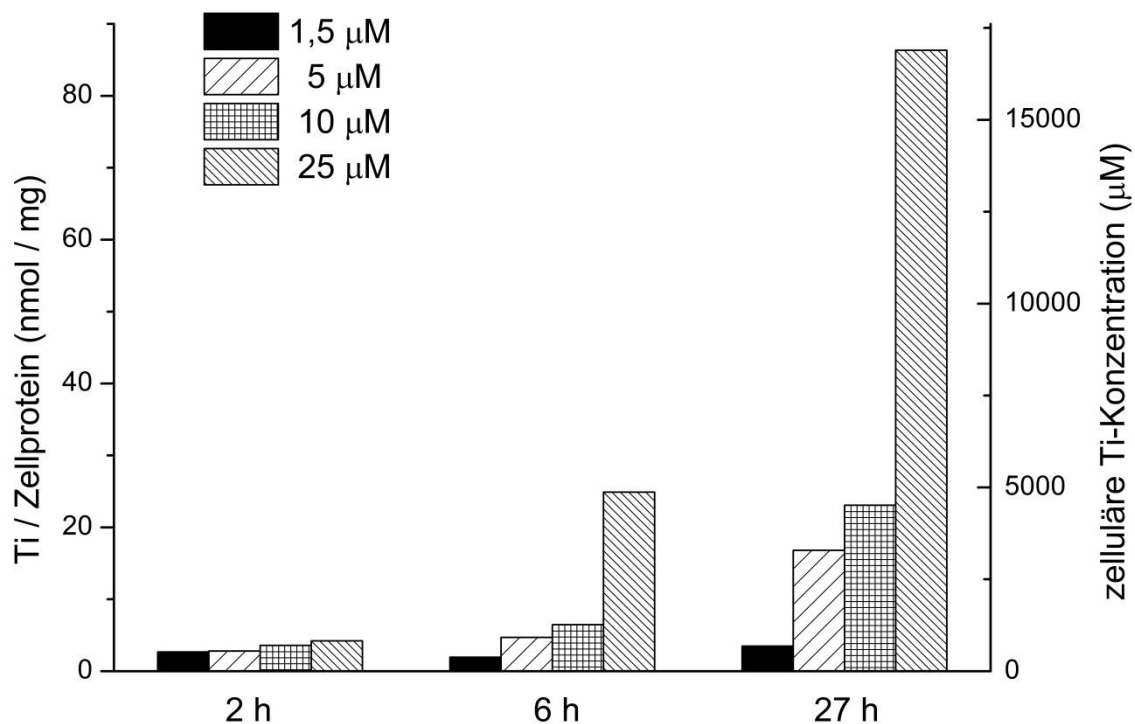
Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Titankomplexe wurden zusätzlich Mitochondrien und Zellkerne aus den Tumorzellen isoliert und die Titankonzentration



in den isolierten Zellorganellen bestimmt. So konnten mögliche Targets für die Titan-komplexe näher eingegrenzt werden.

### 11.1 Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation in Tumorzellen

Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation in Tumorzellen gab einen Hinweis darauf, welche Testkonzentration für die zeitabhängigen Experimente günstig ist. Außerdem konnte mit den erhaltenen Ergebnissen ein möglicher Transportprozess der Titankomplexe durch Zellmembranen postuliert werden.



**Abb. 11-1: : Konzentrationsabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach 2-, 6- und 27-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Titan-Salan-Komplexes  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ . (MW, n = 1-3)**

Die Abb. 11-1 zeigt die Akkumulation in HT-29 Zellen von verschiedenen Konzentrationen (1,5-25  $\mu\text{M}$ ) des Titan-Salan-Komplexes  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  nach 2, 6 und 27 Stunden. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine konzentrationsabhängige Aufnahme erfolgt und bei den Konzentrationen über den  $\text{IC}_{50}$ -Wert (circa 4  $\mu\text{M}$ ) hinaus keine Sättigung der Akkumulation erreicht wird. Insgesamt ist die Anreicherung in der Zelle

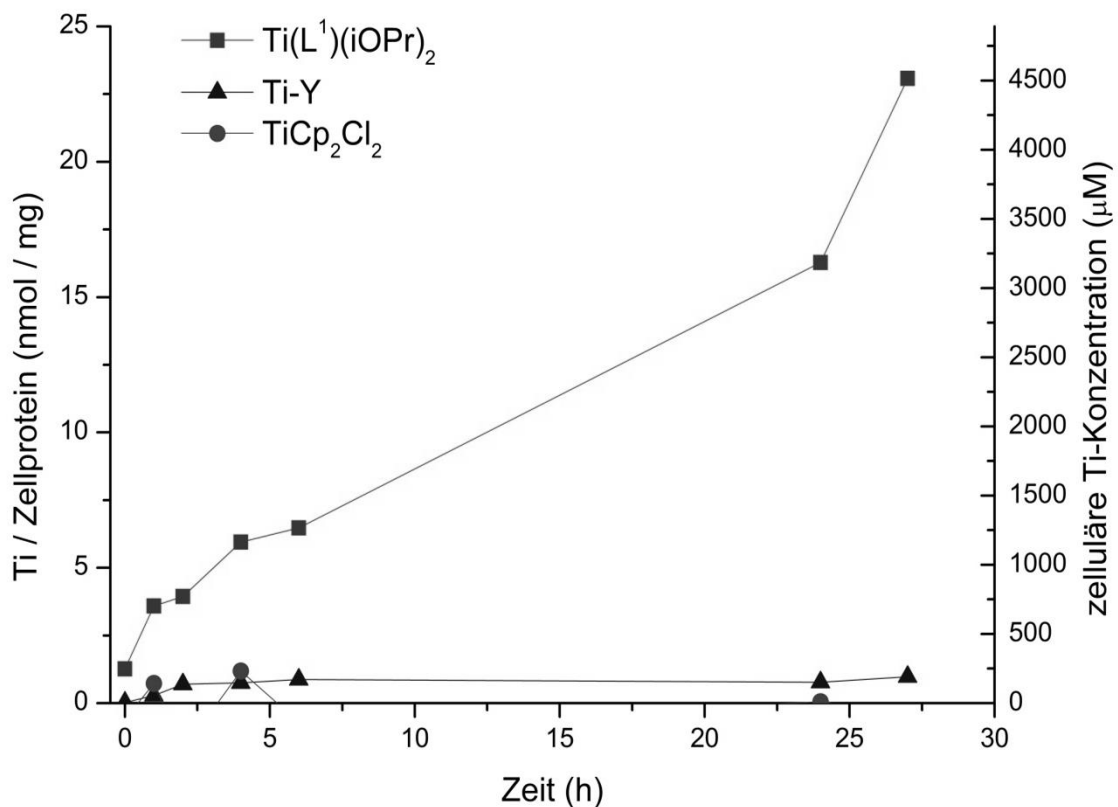
verglichen mit dem extrazellulären Medium als hoch zu bewerten. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  des Titan-Salan-Komplexes konnte nach 6 Stunden eine intrazelluläre Titankonzentration von 1265,9  $\mu\text{M}$  geschätzt werden, was einer Anreicherung von circa 120 entspricht. Für höhere Konzentrationen (25  $\mu\text{M}$ ) und längere Inkubationszeiten (27 Stunden) wurde sogar eine etwa 650-fache Anreicherung gefunden. Die mittlere Anreicherung des untersuchten Titan-Salan-Komplexes nach 6 Stunden betrug 190 bzw. nach 27 Stunden 560. Für Cisplatin wurde von Ghezzi *et al.* eine Anreicherung von circa 6 publiziert [217]. Die Zellaufnahme des Titankomplexes ist konzentrationsabhängig, aber nicht linear. Für Cisplatin wurde eine lineare Abhängigkeit nachgewiesen, die für eine Aufnahme in die Zelle über passive Diffusion spricht. Für den Titankomplex spielen neben der passiven Diffusion sehr wahrscheinlich auch andere Transportmechanismen eine Rolle, wie z.B. der Carrier-vermittelte Transport (siehe 3.1). Für Cisplatin wurden ebenfalls aktive Transportprozesse beschrieben. Ishida *et al.* wiesen einen Transport über den Kupfer-Transporter nach. [218–220]

## 11.2 Zeitabhängigkeit der Akkumulation in Tumorzellen

Die Zellaufnahme der neuartigen Titan(IV)-Komplexe wurde im Vergleich mit Titanocendichlorid über einen Zeitraum von 27 Stunden untersucht. Wie auch in den Bindungsexperimenten wurde der Bromid-substituierte Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  als Leitstruktur dieser Verbindungsklasse ausgewählt. Als Testkonzentration wurde 10  $\mu\text{M}$  gewählt, da es sich dabei um eine Titankonzentration handelt, die sich gut mit der verwendeten HR-CS AAS-Methode quantifizieren ließ und zudem eine relevante Zellaufnahme in den Vorexperimenten zur Konzentrationsabhängigkeit der Zellaufnahme (siehe 11.1) zeigte.

Die drei untersuchten Titankomplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , Titanocen Y und Titanocendichlorid zeigten ein enorm unterschiedliches Zellaufnahmeverhalten (siehe Abb. 11-2). Die höchste zelluläre Titankonzentration mit Werten um 23 nmol Titan pro mg Protein, was einer circa 450-fachen Anreicherung verglichen mit dem Extrazellulärmedium entspricht, konnte für den Titan-Salan-Komplex gemessen werden. Die intrazelluläre Titankonzentration stieg über den gesamten Inkubationszeitraum stetig an. Interessanterweise wurde das Titanocenderivat Titanocen Y nicht im gleichen Ausmaß in den Zellen wiedergefunden. Die Zellaufnahme stieg in den ersten 6 Stunden an, doch erreichte dann ein Plateau mit einer höchsten intrazellulären Konzentration von

etwa 2 nmol Ti pro mg Protein. Die intrazelluläre Titankonzentration nach 27 Stunden wurde auf 191,7  $\mu\text{M}$  geschätzt. Sie liegt damit weit unter der Konzentration des Titan-Salan-Komplexes  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  nach derselben Inkubationszeit (4500  $\mu\text{M}$ ). Die Titankonzentrationen des Titanocendichlorids lagen in fast allen Proben unterhalb der Nachweisgrenze, so dass geschlussfolgert werden konnte, dass Titanocendichlorid nicht in die Zelle aufgenommen wird. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Daten des Titanocendichlorids überein [221]. Dennoch ist es überraschend, dass für Titanocendichlorid über eine biologische Aktivität berichtet wurde [17, 28, 199, 200, 206, 222] und der Komplex die klinische Prüfphase erreichte [23, 28], obwohl er offensichtlich nicht in die Zelle aufgenommen wird. Möglicherweise sind hier extrazelluläre Targets in Betracht zu ziehen.



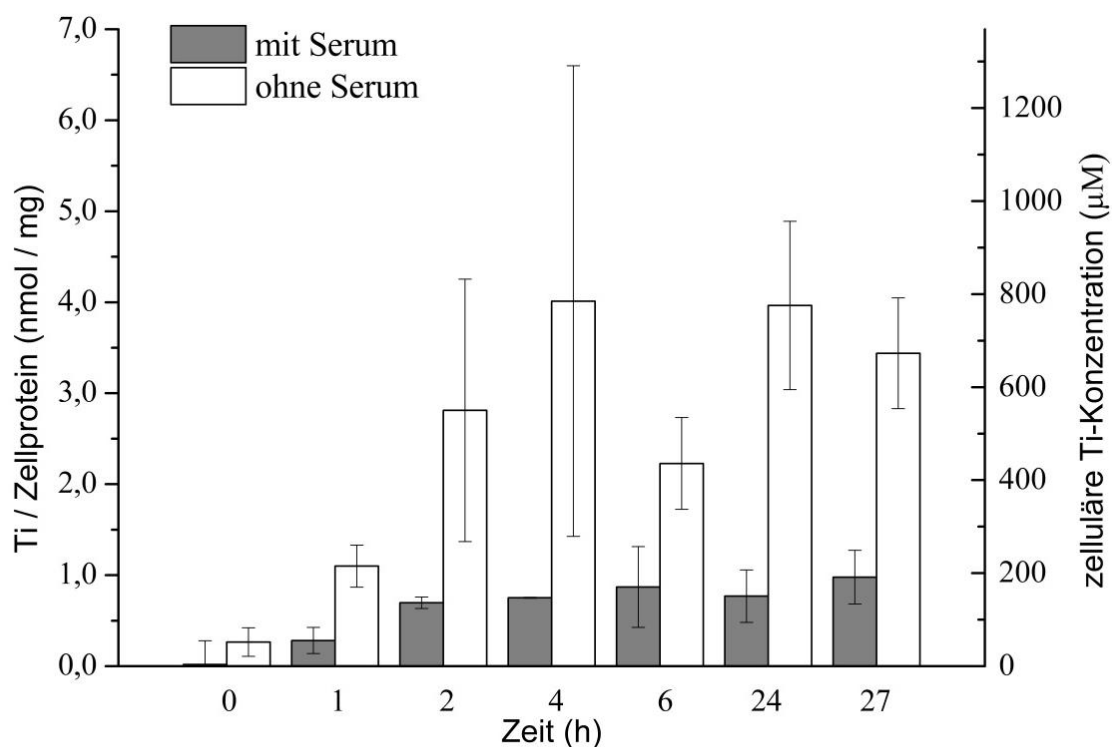
**Abb. 11-2: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Titankomplex ( $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ : Titan-Salan, Ti-Y: Titanocen Y,  $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ : Titanocendichlorid). (MW, n = 2-3)**

Die Ergebnisse der zeitabhängigen Akkumulation in Tumorzellen korrelieren sehr gut mit der *in vitro*-Toxizität der Titan Komplexe. Titanocendichlorid, das bis zur höchsten

Testkonzentration in den Zytotoxizitätsexperimenten keine Aktivität zeigte, akkumulierte nicht in den Zellen. Der Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , welcher den im Vergleich niedrigsten  $\text{IC}_{50}$ -Wert in Tumorzellen aufwies, zeigte die höchste Akkumulation in der Zelle. Für Titanocen Y wurde ein höherer  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt, was mit der geringeren Zellaufnahme des Komplexes in Zusammenhang gebracht werden konnte.

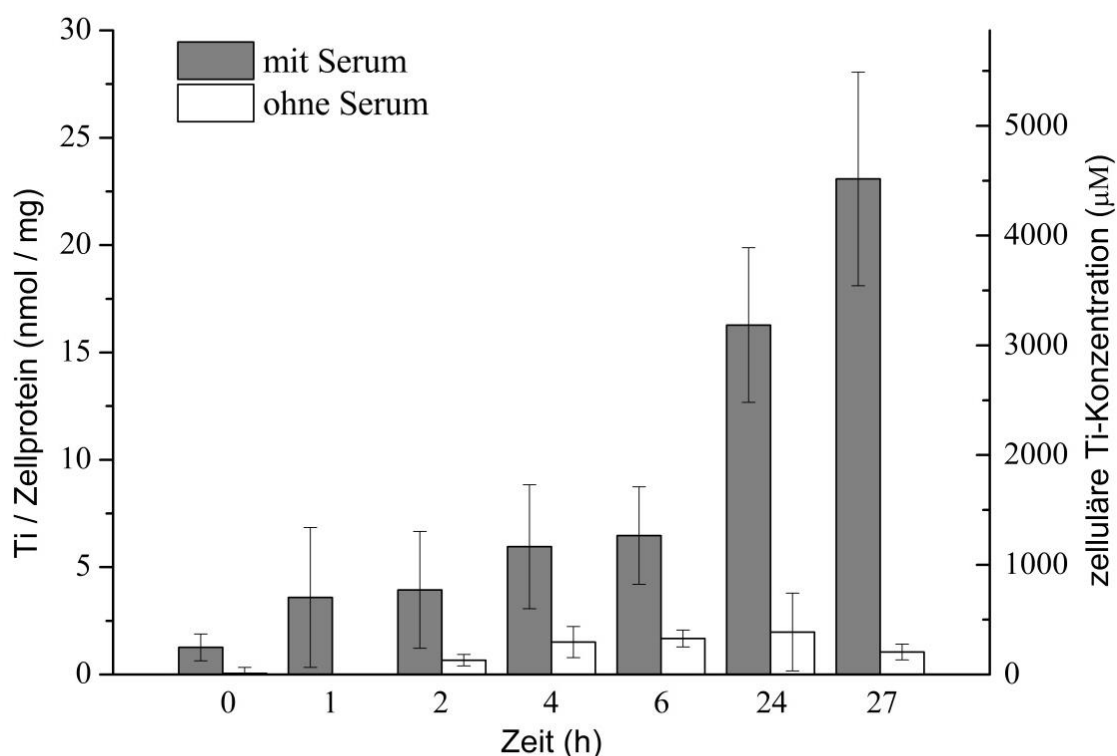
### 11.2.1 Einfluss von Serumproteinen auf die Akkumulation in Tumorzellen

Die drei Titankomplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ , Titanocen Y und Titanocendichlorid zeigten im Bindungsexperiment unterschiedliche Affinitäten zum Serumprotein Albumin (siehe 10.2). Serumalbumin ist der Hauptbestandteil des fetalen Kalbserums, welches standardmäßig als Zusatz zum Zellkulturmedium verwendet wird. Um den Einfluss von Serumproteinen auf die Zellaufnahme genauer zu untersuchen, wurden zusätzliche Zellaufnahmeexperimente ohne die Zugabe von fetalem Kalbserum durchgeführt. Da für Titanocendichlorid keine relevante Titanakkumulation in Tumorzellen beobachtet wurde (siehe 11.2), wurde es von den Folgeexperimenten ausgeschlossen.



**Abb. 11-3: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Titanocen Y in Zellkulturmedium mit Serum (grau) und ohne Serum (farblos). (MW  $\pm$  Stabw., n = 3)**

Die zeitabhängige Zellaufnahme des Titanocen Y in HT-29 Zellen in Zellkulturmedium mit Serum und ohne Serumzusatz ist in Abb. 10-3 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Wie aufgrund der hohen Bindungsaffinität des Titanocen Y zum Serumalbumin erwartet (über 80 % des Komplexes lagen schon nach kurzer Inkubationszeit an das Albumin gebunden vor, siehe 10.2), ist die intrazelluläre Titankonzentration bei Verzicht auf den Serumzusatz stark erhöht. Nach einer Inkubationszeit von 27 Stunden konnte eine circa 65-fache Titananreicherung in der Zelle verglichen mit dem extrazellulären Medium geschätzt werden. Die Anreicherung liegt damit um den Faktor 3,25 höher als in serumhaltigen Medium (20-fache Anreicherung). Die Bindung an Serumproteine scheint somit einen starken Einfluss auf die Zellaufnahme des Titanocen Y zu haben.



**Abb. 11-4: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 10 µM  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  in Zellkulturmedium mit Serum (grau) und ohne Serum (farblos). (MW ± Stabw., n = 3)**

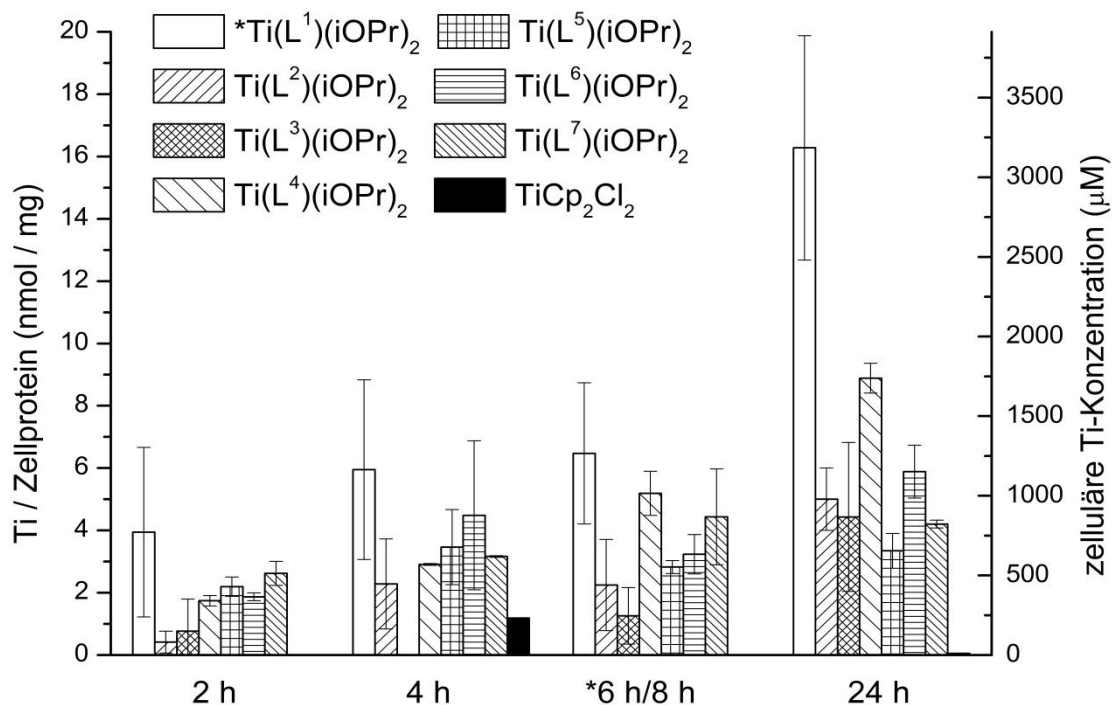
Die Abb. 11-4 zeigt die Ergebnisse der zeitabhängigen Zellaufnahme in HT-29 Zellen des Titan-Salan-Komplexes  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ . Überraschend ist, dass die Titankonzentration in der Zelle bei der Verwendung des serumfreien Zellkulturmediums drastisch

reduziert ist. Erst nach 2 Stunden Inkubationszeit war Titan in den Zellen bestimmbar. Eine maximale zelluläre Titankonzentration wurden nach 24 Stunden erreicht, lag jedoch mit circa 2 nmol Titan pro mg Zellprotein weit unter der maximal gemessenen Konzentration von circa 17 nmol Titan pro mg Zellprotein bei Serumzusatz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass im Fall des Titan-Salan-Komplexes das Serumalbumin und andere Serumproteine, z.B. Transferrin, eine Transporterfunktion ausüben und den Komplex zur Zelle transportieren (ähnlich des postulierten Mechanismus von Tinoco *et al.* [202], siehe Abb. 10-1). Diese These würde die höhere intrazelluläre Akkumulation und höhere Zytotoxizität des Titan-Salan-Komplexes verglichen mit dem Titanocenderivat Titanocen Y erklären.

### 11.2.2 Einfluss des Liganden auf die Zellaufnahme von Titan-Salan-Komplexen

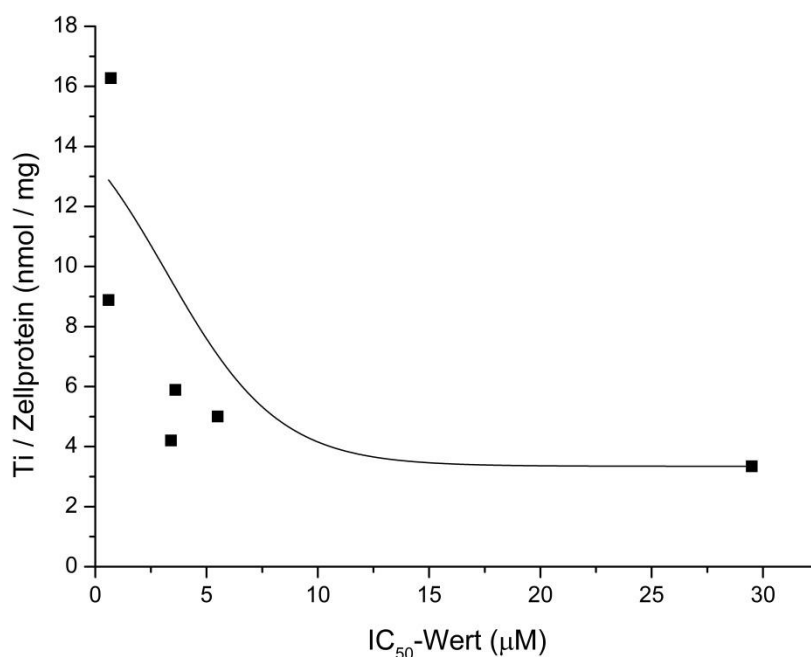
Es sollte untersucht werden, ob der Substituent am Salan-Liganden der Familie der Titan-Salan-Komplexe einen Einfluss auf die Zellaufnahme hat und die eventuellen Unterschiede in der zellulären Akkumulation der Grund für die unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte sind. In Abb. 11-5 ist die zeitabhängige Akkumulation der Titan-Salan-Komplexe  $Ti(L^{1-7})(iOPr)_2$  im Vergleich mit Titanocendichlorid ( $TiCp_2Cl_2$ ) dargestellt. Alle untersuchten Titan-Salan-Komplexe zeigten eine höhere Zellaufnahme als Titanocendichlorid, das kaum in den Proben nachweisbar war. Es wurde eine zeitabhängige Akkumulation der Titan-Salan-Komplexe in den Tumorzellen beobachtet, die nach 24-stündiger Inkubationsdauer in einer zellulären Titankonzentration von wenigstens 600  $\mu M$  resultierte, was einer circa 60-fachen Anreicherung in der Zelle verglichen mit dem extrazellulären Medium entspricht. Die höchste Anreicherung (über 300-fach nach 24 Stunden) wurde für den Bromid-substituierten Titan-Salan-Komplex  $Ti(L^1)(iOPr)_2$  erzielt (siehe auch 11.2). Von den verbleibenden sechs Komplexen zeigte  $Ti(L^4)(iOPr)_2$  die höchste Zellaufnahme, was vermutlich auf den positiven Einfluss des Chlorid-Liganden zurückzuführen ist. Die niedrigste Zellaufnahme nach 24 Stunden konnte für das Trimer  $Ti(L^5)(iOPr)_2$  beobachtet werden. Die stereochemische Konfiguration der Titan-Salan-Komplexe scheint keinen Einfluss auf die Akkumulation in Tumorzellen zu haben (vgl.  $Ti(L^6)(iOPr)_2$  und  $Ti(L^7)(iOPr)_2$ ), ebenso wie der Cyclohexanring der Komplexe  $Ti(L^6)(iOPr)_2$  und  $Ti(L^7)(iOPr)_2$ . Der sterisch gehinderte Titan-Salan-Komplex  $Ti(L^3)(iOPr)_2$ , welcher *tert*-Butyl-Substituenten trägt, zeigte eine über die Inkubationsdauer verlangsamte Zellaufnahme, erzielte jedoch

ähnliche intrazelluläre Titankonzentrationen wie die anderen Komplexe dieser Substanzklasse.



**Abb. 11-5: Zeitabhängige Akkumulation von Titan-Salan-Komplexen in HT-29 Zellen. (MW ± Stabw., n = 2-3)**

Für die Titan-Salan-Komplexe konnte kein linearer Zusammenhang der Zellaufnahme mit den IC<sub>50</sub>-Werten in Tumorzellen gefunden werden (siehe Abb. 11-6). Dennoch ist zu erwähnen, dass die Bromid- und Chlorid-substituierten Titan-Salan-Komplexe mit der höchsten antiproliferativen Aktivität und einem IC<sub>50</sub>-Wert von circa 1 μM auch die höchste Akkumulation in Tumorzellen mit Werten um 17 bzw. 10 nmol Titan pro mg Protein zeigten. Des Weiteren ist interessant, dass für den sterisch gehinderten Komplex Ti(L<sup>3</sup>)(iOPr)<sub>2</sub> eine intrazelluläre Titankonzentration gemessen werden konnte, dieser aber keine Zytotoxizität bis zu einer Testkonzentration von 100 μM aufwies.



**Abb. 11-6: Korrelation der Zellaufnahme mit der Zytotoxizität der Titan-Salan-Komplexe**

### 11.2.3 Zusammenfassung

Für die neuen Titan(IV)-Komplexe konnte eine zeitabhängige Akkumulation in den Tumorzellen belegt werden. Die Referenzsubstanz Titanocendichlorid war nicht in den Zellen nachweisbar. Abhängig vom Liganden (Salan oder Cyclopentadienyl) fand die zelluläre Akkumulation in unterschiedlichem Ausmaß statt und korrelierte mit den IC<sub>50</sub>-Werten der Titanverbindungen. Die höchsten zellulären Titankonzentrationen konnten für den Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  nach 27 Stunden geschätzt werden.

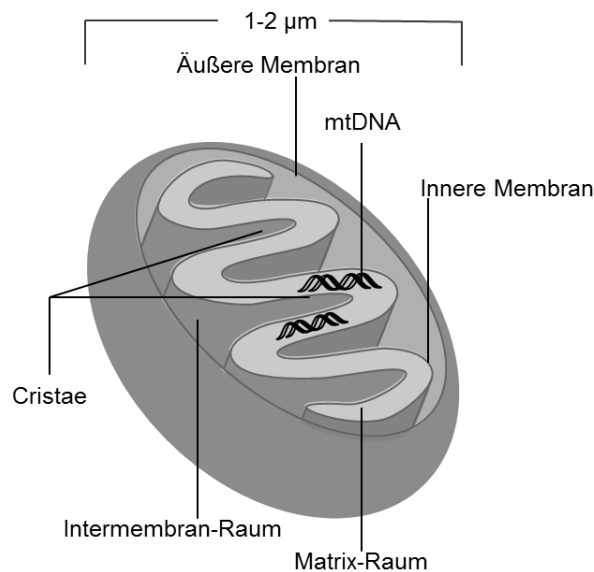
Die Untersuchung des Einflusses der Bindungseigenschaften der Titankomplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  und Titanocen Y zu Serumproteinen lieferte ein interessantes Ergebnis, da beide Komplexe ein gegensätzliches Verhalten zeigten. Bei der Anwesenheit von Serumproteinen war die Zellaufnahme des Titanocen Y erniedrigt, wohingegen die Akkumulation des Titan-Salan-Komplexes in Tumorzellen drastisch gesteigert war.

Die Untersuchung des Ligandeneinflusses auf die Zellaufnahme der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe zeigte, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität der Komplexe und dem Zellaufnahmeverhalten besteht.



### 11.3 Intrazelluläre Verteilung der Titankomplexe

Eukaryontische Zellen sind von einer Zellmembran umgeben und im Innenraum, dem Cytoplasma, in verschiedene Kompartimente, sog. Zellorganellen, strukturiert. Das größte Zellorganell mit einem Durchmesser von 10-20  $\mu\text{m}$  ist der mit dem Lichtmikroskop sichtbare Zellkern, der sog. Nucleus. Er enthält 99 % der genetischen Information einer Zelle, die DNA. Die restlichen 1 % sind in Form von mitochondrialer DNA (mtDNA) in den Mitochondrien gespeichert. Da die neuartigen Titankomplexe eine stärkere DNA-Bindung als Cisplatin zeigten (siehe 10.1) und eine hohe Zellaufnahme besitzen (siehe 11.2), sollte untersucht werden, ob die Titanverbindungen bis in den Zellkern gelangen können, um dort mit der DNA zu interagieren. Dazu wurden Zellkerne aus den Tumorzellen nach Inkubation mit den Titankomplexen isoliert und anschließend auf ihren Titangehalt analysiert. Zur Titanquantifizierung wurde auf die optimierte HR-CS AAS-basierte Methode zur Titanquantifizierung (siehe Kapitel 8) zurückgegriffen.



**Abb. 11-7: Aufbau der Mitochondrien**

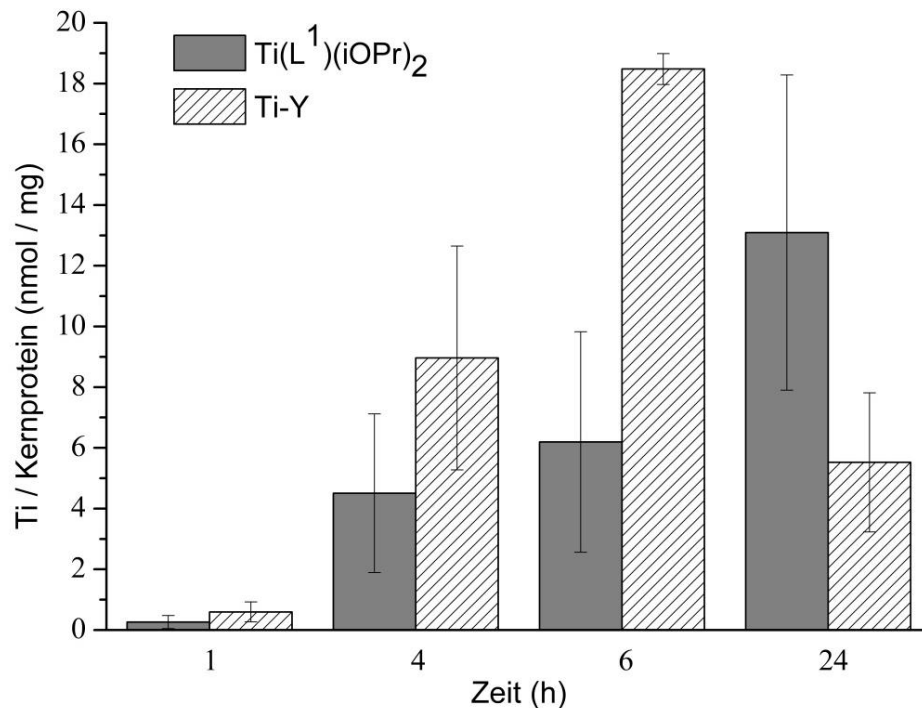
Ein weiteres Zellorganell sind die für den Stoffwechsel der Zelle besonders wichtigen Mitochondrien. Sie dienen der Energieerzeugung, sind 1-2  $\mu\text{m}$  groß und kommen mehrfach in einer Zelle vor, so dass sie etwa 25 % des gesamten Zellvolumens ausmachen. Der besondere strukturelle Aufbau der Mitochondrien ist in Abb. 11-7 dargestellt. Sie sind von zwei Membranen umschlossen: der glatten, äußeren Membran und der eingefalteten, inneren Membran. Die innere Membran umschließt den

Matrix-Raum. Die Einstülpungen der inneren Membran werden als Cristae bezeichnet. Der Intermembran-Raum befindet sich zwischen der inneren und äußeren Membran. Hydrophile Poren in der äußeren Membran erlauben den Austausch von kleinen Molekülen. Die innere Membran ist eher undurchlässig und der Stofftransport kann nur mittels zahlreicher Transporter erfolgen. Nach der von Mereschkowski 1910 erstmals aufgestellten Endosymbionten-Theorie [223] sind Mitochondrien in einer frühen Evolutionsphase aus aeroben Bakterien entstanden, womit die zwei verschiedenen Membranen und die eigene DNA der Mitochondrien erklärt werden. Die Mitochondrien spielen auch eine Rolle beim programmierten Zelltod der Zelle. Der mitochondriale Weg der Apoptose wird von DNA-Schäden oder oxidativem Stress ausgelöst. Da für viele Metallkomplexe, insbesondere für Goldkomplexe ein Einfluss auf den Metabolismus der Mitochondrien beschrieben wurde [224], sollte untersucht werden, ob die Titankomplexe auch in der Lage sind die Membranen der Mitochondrien zu passieren. Aus diesem Grund wurden Mitochondrien aus HT-29 Zellen isoliert und die Titankonzentration in den Mitochondrien quantifiziert.

### **11.3.1 Akkumulation von Titankomplexen in Zellkernen**

Für die Isolierung der Zellkerne aus den Tumorzellen wurde auf eine von Muramatsu *et al.* publizierte Methode zurückgegriffen [225], die leicht modifiziert wurde. Die Tumorzellen wurden demnach nach der Inkubation mit den Titankomplexen in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflächen mit verschiedenen Detergenzien versetzt. Dadurch kam es zum Quellen der Zellen, die anschließend mit Hilfe eines Homogenisators aufgebrochen werden konnten. Durch Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellkerne abgetrennt. Für die weitere Analytik wurden die Zellkerne in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung aufgenommen und in einem Ultraschallbad zerstört. Vor der Bestimmung der Titankonzentrationen in den Zellkernen wurde die Zellkernbiomasse nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Auswertung erfolgte als nmol Titan pro mg Kernprotein. Es wurden Zellkerne nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 4, 6 und 24 Stunden) isoliert. Als Testkonzentration dienten 25 mikromolare Lösungen der Titankomplexe. Im Gegensatz zur totalen Zellaufnahme wurde für dieses Experiment eine höhere Konzentration verwendet, da eine geringere Konzentration in den Zellkernen zu erwarten war (aufgrund der geringen Biomasse des Zellorganells verglichen mit der Gesamtzelle) und damit die Gefahr bestand unterhalb der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze zu liegen. Wie unter 11.1 beschrieben, ist auch bei dieser

Konzentration noch keine Sättigung der Zellaufnahme zu erwarten. Die detaillierte Versuchsdurchführung für die Zellkernisolierung und Bestimmung des Titangehalts ist unter 20.9.2 beschrieben.

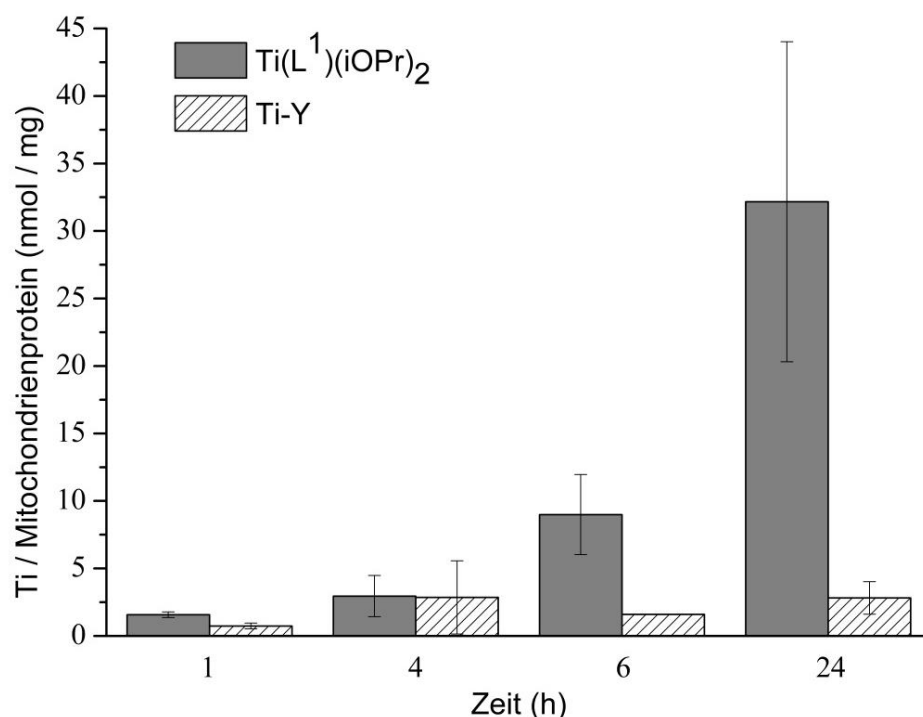


**Abb. 11-8: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in Zellkernen von HT-29 Zellen nach Inkubation mit 25  $\mu$ M Titan-Salan ( $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ ) bzw. Titanocen Y (Ti-Y). (MW  $\pm$  Stabw., n = 4)**

Es wurden in den Zellkernen Titankonzentrationen bis zu 19 nmol pro mg Kernprotein gefunden (siehe Abb. 11-8). Für den Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  konnte eine kontinuierliche Aufnahme über die gesamte Inkubationszeit von 24 Stunden beobachtet werden. Es wurden Werte um 14 nmol Titan pro mg Kernprotein erreicht. Titanocen Y zeigte eine stärkere Akkumulation in den Zellkernen mit maximalen Titankonzentrationen von 19 nmol pro mg Protein nach 6 Stunden. Überraschend war der starke Konzentrationsabfall nach längerer Inkubation (24 Stunden). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Titankomplexe etwa in gleichem Ausmaß in die Zellkerne aufgenommen wurden, obwohl sie unterschiedliche  $\text{IC}_{50}$ -Werte aufwiesen (siehe 9.1). Diese Tatsache lässt vermuten, dass die DNA-Interaktion nicht oder nur teilweise für die antiproliferative Wirkung relevant ist. Die DNA scheint folglich nicht das alleinige Target der Titankomplexe zu sein.

### 11.3.2 Akkumulation in Mitochondrien

Für die Isolierung der Mitochondrien wurde ein spezielles Kit (siehe 19.2) verwendet. Der Isolierungsprozess basierte, ähnlich wie die Isolierung der Zellkerne, auf verschiedenen Dichtegradientenzentrifugationen. Das genaue Versuchsprotokoll ist unter 20.9.3 zu finden. Nach der Isolierung der Mitochondrien wurden diese in einer Pufferlösung aufgenommen und mittels Ultraschall zerstört. Vor der Bestimmung der Titankonzentration in den Mitochondrien wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben nach der Bradford-Methode (siehe 20.8) bestimmt. Die Auswertung erfolgte als nmol Titan pro mg Mitochondrienprotein. Es wurden Zellkerne nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 4, 6 und 24 Stunden) isoliert. Als Testkonzentration dienten, wie zur Untersuchung der Akkumulation in den Zellkernen, 25 mikromolare Lösungen der Titankomplexe, damit identische Versuchsbedingungen gegeben waren.



**Abb. 11-9: Zeitabhängige Akkumulation von Titan in Mitochondrien von HT-29 Zellen nach Inkubation mit 25  $\mu$ M Titan-Salan ( $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$ ) bzw. Titanocen Y ( $\text{Ti-Y}$ ). (MW  $\pm$  Stabw., n = 3-4)**

Die zeitabhängige Aufnahme der Titankomplexe in die Mitochondrien ist in Abb. 11-9 dargestellt. Die untersuchten Titankomplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  und Titanocen Y zeigen eine Akkumulation in den Mitochondrien unterschiedlichen Ausmaßes. Nach Inkuba-

tion mit Titanocen Y konnte kaum Titan in den Mitochondrien bestimmt werden. Die mitochondriale Titankonzentration lag über den gesamten Inkubationszeitraum konstant zwischen 1 und 3 nmol Titan pro mg Mitochondrienprotein. Für den Titan-Salan-Komplex konnte dagegen eine zeitabhängige Akkumulation mit einer maximalen Titankonzentration von circa 30 nmol pro mg Mitochondrienprotein nach 24 Stunden beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Mitochondrien als Wirkort für das Titanocenderivat eher auszuschließen sind. Für den Titan-Salan-Komplex könnte die hohe mitochondriale Akkumulation für ein Target in den Mitochondrien sprechen.

### 11.3.3 Zusammenfassung

Beide untersuchten Titankomplexe konnten in den isolierten Zellkernen von Tumorzellen mit ähnlichen, über die Zeit ansteigenden Konzentrationen nachgewiesen werden. In den Mitochondrien waren dagegen nur geringe Konzentrationen des Titanocen Y zu finden, wohingegen der Titan-Salan-Komplex  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  in hohen Konzentrationen akkumulierte. Diese Ergebnisse könnten für ein mitochondriales Targeting des Titan-Salan-Komplexes sprechen. Für Titanocen Y sind die Zellkerne als Zielorganellen dagegen wahrscheinlicher.

## 11.4 Zusammenfassung

Die untersuchten Titankomplexe mit einem Salan- oder Cyclopentadienyl-Liganden zeigten eine unterschiedliche Bioverteilung. Für den Titan-Salan-Komplex konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme in Tumorzellen mit kontinuierlich steigenden zellulären Titankonzentrationen beobachtet werden. Die Untersuchung der intrazellulären Bioverteilung zeigte, dass der Komplex in Zellkernen und in den Mitochondrien zu finden war. Die mitochondrialen Titankonzentrationen waren etwa doppelt so hoch wie die nuclearen, was für ein mitochondriales Targeting des Titankomplexes mit Salan-Liganden sprechen könnte. Die Akkumulation des Titanocenderivates Titanocen Y in Tumorzellen war vergleichsweise gering. Bei der Untersuchung der intrazellulären Bioverteilung konnte kaum Titan in den Mitochondrien bestimmt werden, wohingegen in den Zellkernen mit dem Titan-Salan-Komplex vergleichbare Konzentrationen gefunden werden konnten. Für Titanocen Y ist daher der

Zellkern als Zielorganell eher in Betracht zu ziehen. Titanocendichlorid zeigte bei den Untersuchungen zur Bioverteilung keine relevante Aufnahme in Tumorzellen.

## 12. Zusammenfassende Diskussion

Es wurden die biochemischen Eigenschaften sowie die Bioverteilung neuartiger, antitumoraktiver Titan(IV)-Komplexe mit Salan- oder Cyclopentadienyl-Liganden untersucht. Die Experimente wurden im Hinblick auf die Aufklärung des bisher unbekannten Wirkmechanismus dieser Substanzklassen durchgeführt.

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die zu untersuchenden Titankomplexe antiproliferative Eigenschaften aufweisen. Zur weiteren Charakterisierung dieser Eigenschaften wurden die  $IC_{50}$ -Werte der Titankomplexe in zwei weiteren Tumorzelllinien bestimmt. Es wurden humane Brust- und Darmkrebszelllinien ausgewählt, da es die am meisten verbreiteten Krebsformen sind. Für die Leitstruktur der Titan-Salan-Komplexe als auch für das Titanocenderivat Titanocen Y konnten  $IC_{50}$ -Werte im unteren mikromolaren Bereich berechnet werden. Für den Referenzkomplex Titanocendichlorid, welcher in den 1990er Jahren in der klinischen Prüfphase getestet wurde, konnte dagegen kein  $IC_{50}$ -Wert bis zur höchsten Testkonzentration von 500  $\mu M$  ermittelt werden. Auch etablierte Zytostatika, wie der Platinkomplex Cisplatin, zeigten mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 5  $\mu M$  und 10  $\mu M$  eine geringere Antitumoraktivität als die neuartigen Titan(IV)-Komplexe. Untersuchungen an gesunden Zellen (Mausfibroblasten) ergaben, dass die Titankomplexe vermutlich keine selektive Wirkung für Tumorzellen besitzen. Aus den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe wurde ersichtlich, dass die antiproliferative Potenz stark vom Substituenten am Salan-Liganden und damit von der chemischen Struktur des Komplexes abhängt. Elektronenziehende Substituenten, wie die Halogenide, waren besonders vorteilhaft für die antiproliferative Aktivität dieser Substanzklasse.

Zur Untersuchung der *in vivo*-Toxizität der Titankomplexe auf den Gesamtorganismus und die Embryonalentwicklung wurde der Zebrafischembryo als Modellorganismus verwendet. Die  $LC_{50}$ -Werte der neuen Titan(IV)-Komplexe im Zebrafischembryo lagen deutlich höher als die in Tumorzellen ermittelten  $IC_{50}$ -Werte. Bei Inkubation mit dem Komplex Titanocendichlorid, der keine zytotoxischen Eigenschaften in Tumorzellen aufwies, traten toxische Effekte im Zebrafischembryo auf. Da es sich bei den *in vivo*-Experiment im Zebrafischembryo nur um ein erstes Screening handelt und dieses nicht mit den *in vivo*-Experimenten in der Maus vergleichbar ist, bieten die

Ergebnisse nur einen Hinweis darauf, dass der Titan-Salan-Komplex und Titanocen Y eine vergleichsweise geringe Toxizität im Gesamtorganismus besitzen, obwohl sie antiproliferativ gegen Tumorzellen wirken.

In Bindungsexperimenten wurden die Affinitäten der Titankomplexe zu Biomolekülen charakterisiert. Als Biomolekül war insbesondere die DNA interessant, da sie das Target vieler Antitumorwirkstoffe ist. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Titan als Zentralatom für die Bindungseigenschaften relevant ist, sondern die Eigenschaften des Liganden die Bindungsaffinität bestimmen. Die Titanocenderivate (Titanocendichlorid und Titanocen Y) zeigten eine höhere Affinität zur DNA als der Titankomplex mit Salan-Ligand, weshalb für letzteren die DNA als Target eher unwahrscheinlich ist. Als weiteres Biomolekül war das Serumalbumin im Blutplasma des Menschen für die Titankomplexe relevant, da das Albumin in der Literatur als Transporter für Metallkomplexe diskutiert wird. Die Bindungsexperimente zeigten, dass die untersuchten Titankomplexe unterschiedliche Affinitäten zum Serumalbumin besitzen. Ähnlich der DNA-Bindungsexperimente besaßen die Titanocenderivate höhere Affinitäten zum Serumalbumin als der Titan-Salan-Komplex. Die Relevanz der unterschiedlichen Bindungseigenschaften wurde in weiterführenden Experimenten zur Bioverteilung der Titankomplexe genauer untersucht.

Zur Untersuchung der Bioverteilung der Komplexe wurde eine auf der Atomabsorptionsspektrometrie basierende Methode zur Quantifizierung von Titan in biologischem Material mit einer Nachweisgrenze im unter  $\mu\text{g/L}$ -Bereich entwickelt. Mit der optimierten Methode konnten bekannte Störeffekte von AAS-Signalen, wie *Memory*-Effekte und das *Tailing*, verhindert werden. Der Optimierungsprozess ergab eine ideale Pyrolyse- bzw. Atomisierungstemperatur von  $1400\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw.  $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Außerdem war der Zusatz von Triton®-X100 sowie 13 %-iger Salpetersäure zur Stabilisierung der Suspension nötig. Darüber hinaus wurde belegt, dass eine Anpassung des Proteingehalts aller Proben auf dieselbe Konzentration vor der Messung erforderlich ist, um den Einfluss der Proteinkonzentration auf die gemessene Absorption zu eliminieren.

Unter Anwendung der entwickelten AAS-Methode konnte die Titankonzentration in Tumorzellen nach Inkubation mit den Titankomplexen bestimmt werden. Für die untersuchten Komplexe  $\text{Ti}(\text{L}^1)(\text{iOPr})_2$  und Titanocen Y lag eine zeitabhängige Zellaufnahme, die in unterschiedlichen zellulären Titankonzentrationen resultierte, vor. Der Titan-Salan-Komplex zeigte eine um den Faktor 20 erhöhte Anreicherung in der Tu-



morzelle als Titanocen Y. Bei der Abwesenheit von Serumproteinen konnte die Zellaufnahme des Titanocen Y jedoch gesteigert werden, wohingegen die Akkumulation des Titan-Salan-Komplexes in Tumorzellen drastisch reduziert wurde. Innerhalb der Substanzklasse der Titan-Salan-Komplexe konnte ein Einfluss des Liganden auf die Zellaufnahme beobachtet werden. Die zelluläre Titankonzentration korrelierte jedoch nicht mit der Zytotoxizität der Komplexe.

Die Untersuchung der intrazellulären Bioverteilung ergab eine unterschiedliche Lokalisation der Titankomplexe mit Salan- bzw. Cyclopentadienyl-Liganden in der Tumorzelle. Es konnten hohe Konzentrationen des Titan-Salan-Komplexes in den Mitochondrien und moderate Konzentrationen im Zellkern bestimmt werden. Für Titanocen Y war dagegen nur eine relevante Akkumulation in Zellkernen zu beobachten. Mit Blick auf die insgesamt geringere Zellaufnahme dieses Komplexes und den damit verglichen hohen Konzentrationen des Titanocen Y im Zellkern, scheint dieses Zellorganell als Target wahrscheinlich.

### **Schlußfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Titan(IV)-Komplexe mit Salan- oder Cyclopentadienyl-Liganden ein sehr unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Toxizität, Affinität zu Biomolekülen und Bioverteilung besitzen. Der Titan-Salan-Komplex weist eine nur geringe Bindungsaffinität zur DNA und Serumalbumin auf, akkumuliert jedoch serumabhängig und in hohen Konzentrationen in der Zelle. Die Zellaufnahme des Titanocen Y ist vergleichsweise gering, die Affinitäten zu Biomolekülen dagegen hoch. Auch die Untersuchungen zur Bioverteilung lassen einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der untersuchten Titankomplexe vermuten. Während für Titanocen Y der Transport in den Zellkern und die Bindung zur DNA entscheidend zu sein scheinen, sind für den Titan-Salan-Komplex die Mitochondrien als Zielorganell wahrscheinlicher. Insgesamt konnten die Untersuchungen zeigen, dass Titankomplexe keine einheitliche Reaktivität und Bioverteilung besitzen und sich die biologischen Eigenschaften von Titankomplexen durch die Ligandenwahl beeinflussen lassen. Für die weitere Forschung an Titankomplexen wäre die weitere Eingrenzung möglicher Targets interessant. Insbesondere die Titan-Salan-Komplexe, für die ein andersartiger Wirkmechanismus zu vermuten ist, besitzen ein hohes Potential für den Einsatz als Antitumorwirkstoffe. Außerdem wäre die Suche nach alternativen

Liganden für Titankomplexe, die die Reaktivität und Bioverteilung gezielt modifizieren, erstrebenswert.

## **IV Synthese und biologische Eigenschaften von Platin(II)-Alkynyl-Komplexen**

## 13. Synthese, Strukturaufklärung und Stabilität von Platin(II)-Alkynyl-Komplexen

Die Synthesen, Strukturaufklärung und Stabilitätsuntersuchungen einiger Platin-Alkynyl-Komplexe des Typs  $[Pt(cod)(CCR)_2]$  und  $[Pt(cod)(Me)(CCR)]$  wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Köln im Arbeitskreis von Prof. Dr. Axel Klein durchgeführt [44, 226].

### 13.1 Wirkstoffdesign

Bei den Platin-Alkynyl-Komplexen handelt es sich um eine neuartige Familie von Platin-Komplexen, die einen Olefin-Chelat-Liganden in Kombination mit einem elektronenreichen Alkyl- oder Alkynyl-Koliganden besitzen. Als Olefin-Chelat-Ligand wurde stets ein hydrophober 1,5-Cyclooctadien (cod)-Ligand verwendet, als Alkyl-Ligand eine Methyl-Gruppe. Die Alkynyl-Koliganden unterlagen einer systematischen Ligandenvariation. Es wurden vorwiegend Phenylacetylid-Liganden, die sich in der Substitution des Phenylrings unterscheiden, eingesetzt (siehe Abb. 13-1).

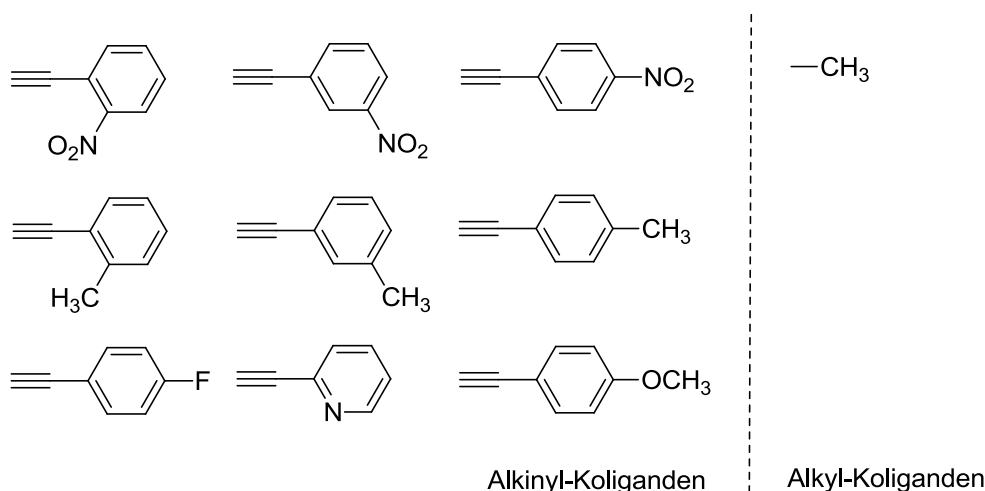
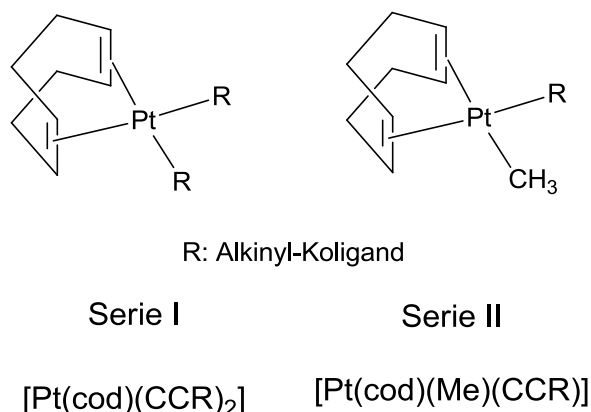


Abb. 13-1: Ligandensatz

Die unterschiedlichen Substituenten führten zu einer unterschiedlichen elektronischen Struktur der Komplexe. Elektronenschiebende bzw. elektronenziehende Substituenten haben einen Effekt auf die CC-Dreifachbindung, die über eine  $\sigma$ -Bindung an das Platin gebunden ist. Als elektronenschiebender Substituent wurde z.B. die

Methoxy-Gruppe und als elektronenziehender Substituent u.a. die Nitro-Gruppe verwendet. Zusätzlich wurden die Substituenten an verschiedenen Positionen des aromatischen Rings (*ortho*, *meta*, *para*) eingeführt um den Einfluss der 2-, 3-, 4-Position näher zu untersuchen. Neben den Phenylacetylid-Liganden wurde zusätzlich ein Ethinylpyridin-Ligand verwendet.

Die synthetisierten cod-Platin(II)-Komplexe ließen sich in zwei Serien nach ihrem Strukturtyp einteilen (siehe Abb. 13-2). Bei der Serie I handelt es sich um cod-Platin-Komplexe mit zwei identischen Alkynyl-Koliganden. Sie werden im Folgenden auch als symmetrische Platin-Alkynyl-Komplexe oder Dialkynyl-Komplexe bezeichnet. Die Serie II ist charakterisiert durch unterschiedliche Liganden am Platin. Zum einen ist ein Methyl-Koligand und zum anderen ein Alkynyl-Koligand an das Platin koordiniert. Sie werden daher als unsymmetrisch bezeichnet.



**Abb. 13-2: Organometallische cod-Platin(II)-Komplexe**

Von Klein *et al.* wurden bereits einige der Platinkomplexe des Typs  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CCR})_2]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CCR})]$  synthetisiert und charakterisiert [44, 226]. Es handelt sich dabei um die in Tab. 13-1 gelisteten Verbindungen. Es wurden die Platin-Alkynyl-Komplexe  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$  im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und charakterisiert.

**Tab. 13-1: Liste der von Klein *et al.* synthetisierten Platin-Alkynyl-Komplexe. (blau: Serie I, grün: Serie II)**

Typ [Pt(cod)(CCR) <sub>2</sub> ]	Typ [Pt(cod)(Me)(CCR)]
[Pt(cod)(CCPh) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CCPh)]
[Pt(cod)(CC(2Me)Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(2NO <sub>2</sub> )Ph)]
[Pt(cod)(CC(2NO <sub>2</sub> )Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(3Me)Ph)]
[Pt(cod)(CC(3Me)Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(3NO <sub>2</sub> )Ph)]
[Pt(cod)(CC(3NO <sub>2</sub> )Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]
[Pt(cod)(CC(4Me)Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(4NO <sub>2</sub> )Ph)]
[Pt(cod)(CC(4NO <sub>2</sub> )Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(4F)Ph)]
[Pt(cod)(CC(4F)Ph) <sub>2</sub> ]	[Pt(cod)(Me)(CC(Py)Ph)]
[Pt(cod)(CC(Py)Ph) <sub>2</sub> ]	

## 13.2 Darstellung der Platin-Alkynyl-Komplexe

### 13.2.1 Synthese der Liganden

Die verwendeten Alkin-Liganden wurden größtenteils käuflich erworben. Die Synthese der nicht käuflich erworbenen Liganden 2-Nitrophenylacetylen, 3-Nitroacetylen und 4-Nitroacetylen wurde von Klein *et al.* durchgeführt [44, 226].

### 13.2.2 Synthese der Platinkomplexe

Die Synthese der Platin-Alkynyl-Komplexe des Typs [Pt(cod)(CC(R)<sub>2</sub>)] erfolgte nach einer publizierten Methode mit wenigen Modifizierungen (siehe Abb. 13-3) [44, 226]. Der käuflich erworbene Präkursor-Komplex [PtCl<sub>2</sub>(cod)] wurde zunächst in wenig eiskaltem Ethanol suspendiert. Anschließend wurde der zuvor deprotonierte Alkin-Ligand hinzugegeben. Die Deprotonierung erfolgte mittels Natriumethanolat in Ethanol. Nach 2-stündigem Rühren in der Kälte wurde der Platin-Alkynyl-Komplex durch Entfernen des Lösemittels und Umkristallisieren erhalten (siehe dazu auch 20.1.2). Für den synthetisierten Komplex [Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>] wurde eine Ausbeute von 38 % erzielt. Die geringe Ausbeute lag an der geringen Ansatzgröße, die eine vollständige Isolation des synthetisierten Produkts erschwerten. Durch Verwendung größerer Ansätze sowie Optimierung des Syntheseverfahrens ist hier sicherlich eine

Steigerung zu erzielen. Klein *et al.* wandten für einige Platin-Alkynyl-Komplexe alternative Syntheserouten an, u.a. Verwendung von Natriumethanolat anstatt Natriummethanolat oder Umsetzung mit *p*-Tolylacetylen und Kupferiodid, und erzielten dabei variierende Ausbeuten von 36 bis 90 % [44, 226].

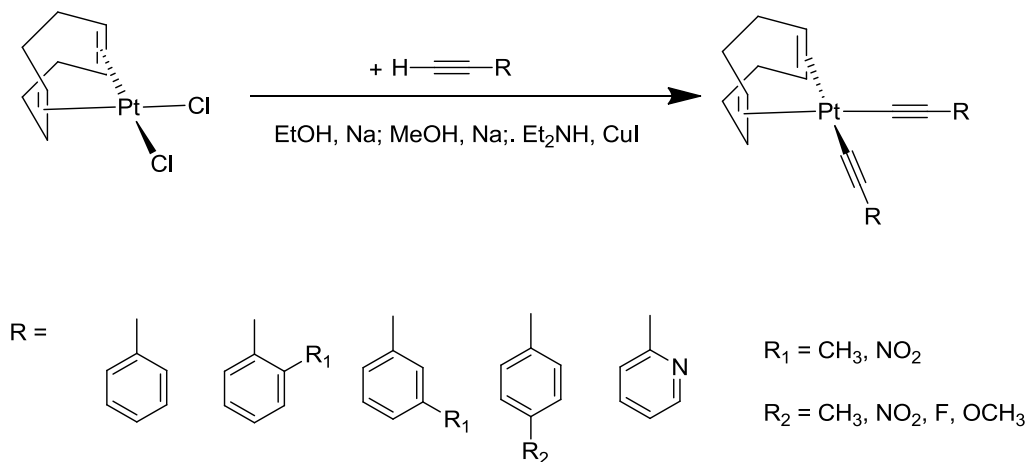


Abb. 13-3: Syntheschema der Serie I

Die Synthese der Serie II erfolgte ausgehend vom Präkursor-Komplex  $[\text{PtCl}(\text{cod})(\text{Me})]$ , der nach einer von Clark *et al.* publizierten Vorschrift synthetisiert wurde [227]. Das Syntheschema der Platin-Alkynyl-Komplexe des Typs  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CCR})]$  ist in Abb. 13-4 abgebildet.

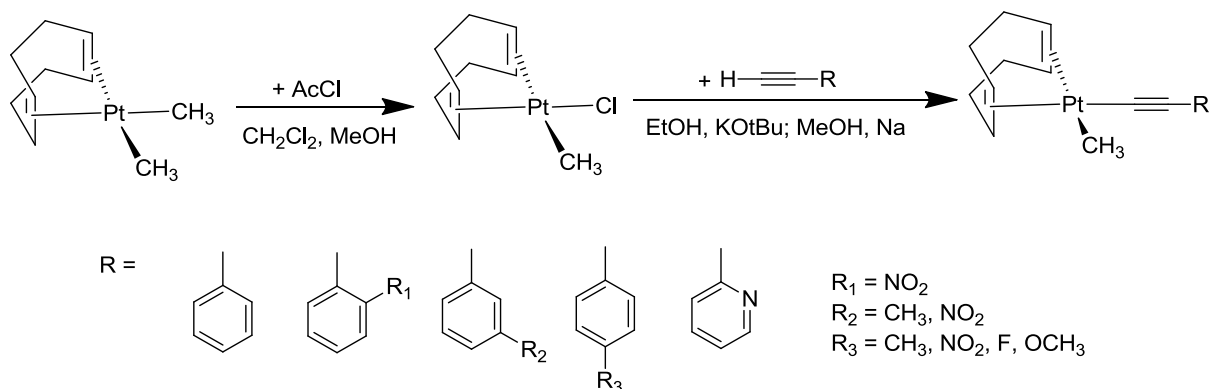


Abb. 13-4: Syntheschema der Serie II

Zunächst wurde durch Umsetzung des Präkursor-Komplexes  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})_2]$  mit Acetylchlorid ( $\text{AcCl}$ ) in Dichlormethan/Methanol das Zwischenprodukt  $[\text{PtCl}(\text{cod})(\text{Me})]$  erhalten (Ausbeute 67 %). *In situ* wurde dabei  $\text{HCl}$  gebildet, das den Austausch nur eines Methyl-Liganden gegen einen Chlorido-Liganden ermöglicht. Dieser Umweg war nötig, da aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Platin-Kohlenstoff-Bindung ge-

genüber Mineralsäuren bei einer direkten Umsetzung mit HCl der dichlorierte Komplex entsteht. Der Austausch des Chlorido-Liganden erfolgte analog zur Serie I mit Natriummethanolat in kaltem Ethanol. Der Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})]$  wurde nach Abtrennen des Lösemittels durch Filtration und Umkristallisation mit einer Ausbeute von 59 % erhalten. Die von Klein *et al.* synthetisierten Komplexe der Serie II wurden in einer alternativen Syntheseroute dargestellt, die in den entsprechenden Publikationen nachzulesen sind [44, 226]. Die erzielten Ausbeuten lagen dabei zwischen 34 und 90 %.

### 13.2.3 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der von Klein *et al.* synthetisierten Platin-Alkynyl-Komplexe ist in der Literatur zu finden [44, 226]. Sie wurden mittels NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie, Elementaranalyse und teilweise durch Röntgenstrukturanalyse sowie elektrochemisch untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Komplexe  $[\text{PtCl}(\text{cod})(\text{Me})]$ ,  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})_2]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})]$  NMR-spektroskopisch und mittels Elementaranalyse charakterisiert. Die NMR-Spektroskopie eignet sich zur Strukturaufklärung der Platin-Alkynyl-Komplexe, da sich Protonen an allen Liganden der Komplexe befinden. So konnte der Syntheserfolg leicht überprüft werden. In Abb. 13-5 sind die erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der synthetisierten Platin-Alkynyl-Komplexe sowie das Spektrum des als Edukt verwendeten Alkins 4-Methoxyphenylacetylen dargestellt. In beiden Spektren der Platin-Alkynyl-Komplexe (Abb. 13-5 Mitte und unten) ist die Abwesenheit des Alkin-Protons bei circa 3 ppm klar zu erkennen. Das spricht für eine vollständige Umsetzung des Edukts. Im Falle des symmetrischen Platin-Alkynyl-Komplexes  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})_2]$  lassen sich alle Signale eindeutig den entsprechenden Protonen zuordnen (siehe farbige Markierungen in der Abb. 13-5). Beim unsymmetrischen Platin-Alkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})]$  konnte eine Aufspaltung des Signals für die olefinischen cod-Protonen (4,89 ppm und 5,46 ppm) beobachtet werden. Dieser Effekt ist interessant und könnte für eine Kopplung der cod-Protonen mit dem Platin sprechen. Zur genaueren Abklärung und exakten Zuordnung der olefinischen cod-Protonen ist die Aufnahme eines  $^{195}\text{Pt}$ -NMR-Spektrum erforderlich.



Die Reinheit der Komplexe wurde mittels Elementaranalyse überprüft. Die experimentellen Daten sind unter 20.1.2 zu finden. Mit Abweichungen von  $< 0,7 \%$  zum berechneten Wert konnte die Reinheit der Verbindungen gezeigt werden.

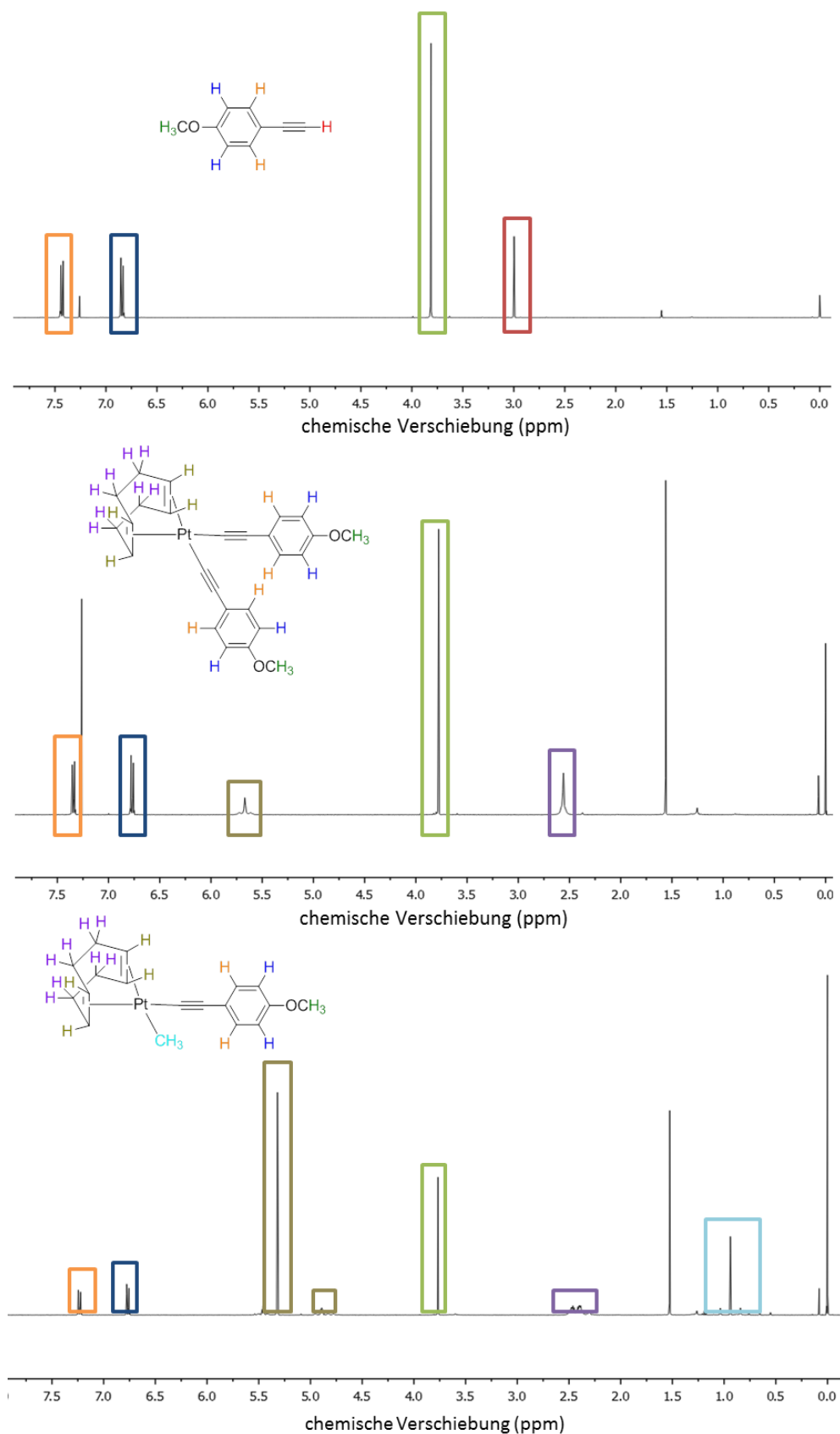


Abb. 13-5:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  von 4-Methoxyphenylacetylen (oben) und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$  (Mitte), in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  von  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$  (unten)

### 13.3 Stabilitätsuntersuchungen

Für ausgewählte Platin-Alkynyl-Komplexe wurde die Stabilität in Dimethylformamid (DMF) sowie gegenüber verschiedenen biologisch relevanten Molekülen bzw. Ionen NMR- oder UV/Vis-spektroskopisch untersucht [226].

DMF wurde in den biochemischen Experimenten als Lösemittel verwendet, weshalb die Untersuchung der Stabilität in diesem Lösemittel besonders wichtig ist. Nach dem HSAB-Konzept [128] ist eine Koordination an das Platin über das Stickstoffatom des DMF wahrscheinlich. Die zeitabhängigen NMR- und UV/Vis-Spektren ergaben, dass es nach circa 3-4 Tagen zu einer Zersetzung der Komplexe unter Bildung von cod-Dimethyl- oder cod-Dialkynyl-Komplexen (Serie II) bzw. Produkten unbekannter Struktur (Serie I) kam. Gegenüber Chlorid-Ionen, die per se in allen Zellen vorhanden sind, und dem biologische relevanten Triglycerid Glutathion (siehe Kapitel 17) konnte eine sehr langsame Zersetzung des getesteten, unsymmetrischen Komplexes  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4NO}_2)\text{Ph})]$  beobachtet werden. Das Cystein-haltige Glutathion spielt eine wichtige Rolle im Redoxstoffwechsel der Zelle und ist das Substrat der Glutathionreduktase (siehe 4.3.1). Außerdem ist die Deaktivierung der Platinkomplexe durch Bindung zu Glutathion ein möglicher Mechanismus, der die Cisplatin-Resistenzen verursacht [41].

Im Hinblick auf die Anwendung dieser Komplexfamilie als Antitumorwirkstoffe wären weiterführende Stabilitätsuntersuchungen unter physiologischen Bedingungen, z.B. in Blutplasma mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, sehr interessant.

### 13.4 Zusammenfassung

Die cod-Platin-Komplexe mit Methyl/Alkynyl-und Dialkynyl-Koliganden wurden mit ausreichender Reinheit synthetisiert. Hinsichtlich der erzielten Ausbeuten ist eine Verbesserung durch Optimierung der Aufreinigungsschritte möglich. Die Stabilitätsuntersuchungen ergaben eine ausreichende Stabilität der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe in dem für die biologischen Experimente verwendeten Lösemittel (DMF) sowie gegenüber ausgewählten biologisch relevanten Molekülen bzw. Ionen (Chlorid, Glutathion). Die Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen stehen noch aus.

## 14. Toxikologische Untersuchungen

Toxikologische Untersuchungen im Zellkulturmodell dienen als erstes Screening für neue Wirkstoffe um ihre antiproliferativen Eigenschaften gegen Tumorzellen zu charakterisieren. Ist ein Einsatz als potentieller Antitumorwirkstoff angedacht, so werden Aktivitäten im unteren mikromolaren Bereich angestrebt, was einer ausreichend hohen Potenz für den klinischen Einsatz entspricht. Neben der Potenz eines Arzneistoffs spielt jedoch auch die Toxizität eine entscheidende Rolle. Aus der Potenz und Toxizität ergibt sich die therapeutische Breite eines Arzneistoffs, die genauer definiert ist als Quotient aus der mittleren letalen Konzentration ( $LC_{50}$ ) und der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) (siehe Formel 14-1). Die  $LC_{50}$  entspricht der Konzentration, bei der 50 % aller Zellen bzw. Individuen sterben. Die  $EC_{50}$  ist die Konzentration, bei der 50 % aller Zellen bzw. Individuen den gewünschten therapeutischen Effekt zeigen.

$$\text{therapeutische Breite} = \frac{LC_{50}}{EC_{50}}$$

**Formel 14-1: Therapeutische Breite ( $LC_{50}$ : mittlere letale Konzentration,  $EC_{50}$ : mittlere effektive Konzentration)**

Für die neue Substanzklasse der Platin-Alkynyl-Komplexe wurde die Zytotoxizität als mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) in zwei verschiedenen Tumorzelllinien sowie in Mausfibroblasten bestimmt und daraus Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet. Die  $IC_{50}$  ist die Konzentration, die eine 50 %-ige Inhibition *in vitro* verursacht. Sie entspricht dabei der  $EC_{50}$ -Konzentration, die die entsprechende Konzentration *in vivo* beschreibt (s.o.). Im Tumorzellmodell bedeutet das, dass 50 % aller Tumorzellen absterben. Außerdem wurden identische Experimente an einer gesunden Zelllinie (Mausfibroblasten) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Komplexe selektiv auf Tumorzellen wirken.

Die *in vivo*-Toxizität der Platinkomplexe wurde mit Hilfe des Zebrafisches als Modellorganismus untersucht. Eine hohe Toxizität in diesem Screening könnte ein Indiz für eine geringe therapeutische Breite des Arzneistoffs sein, was ungünstig im Hinblick

auf einen potentiellen Einsatz als Arzneistoff wäre bzw. eine gut kontrollierte Therapie bedürfe.

### 14.1 Zytotoxizität im Zellkulturmodell

Die Platin-Alkynyl-Komplexe wurden im Zellkulturmodell in zwei verschiedenen Tumorzelllinien, sowie ausgewählte Derivate zusätzlich in einer gesunden Zelllinie auf ihre antiproliferativen Eigenschaften getestet und mit Cisplatin als Referenz verglichen. Bei den verwendeten Tumorzelllinien handelte es sich um HT-29 Darmkrebszellen und MCF-7 Brustkrebszellen. Das erste Screening von neuen potentiellen Arzneistoffen auf Zytotoxizität wird häufig in diesen beiden Tumorzelllinien durchgeführt, da Darmkrebs die zweithäufigste Krebsart bei Männern und Frauen ist und Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei der Frau (siehe 1.1). Hinzu kommt, dass es sich beim Brustkrebs um einen hormonabhängigen Tumor handelt, so dass auch östrogenabhängige Effekte untersucht werden können. Um auch die Effekte der Platin-Alkynyl-Komplexe auf gesunde Zellen zu untersuchen, wurden die  $IC_{50}$ -Werte in Mausfibroblasten für ausgewählte Komplexe bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Platinkomplexe für 3 (HT-29) bzw. 4 Tage (MCF-7, L-929) inkubiert. Nach einer anschließenden Fixierung der noch lebenden Zellen, konnten diese mit dem Farbstoff Kristallviolett angefärbt und mittels UV-Messungen quantifiziert werden. Durch den Vergleich mit einer Kontrollplatte, die dieselbe Behandlung ohne Substanzzugabe durchlaufen hat, wurde der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt. Die genaue Berechnung sowie das Versuchsprotokoll sind unter 20.3 zu finden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Präkursor-Platinkomplex  $[Pt(cod)Cl_2]$  keine Aktivität gegen Tumorzellen besitzt [46]. Der Austausch eines Chlorido-Liganden gegen einen Methyl-Ligand bewirkte dagegen schon eine Erhöhung der Toxizität um mehr als das 10-fache, wie Butsch *et al.* zeigten [46]. Das Einfügen von Phenylalkynyl-Liganden an die Stelle des Chlorido-Liganden (Serie II) bewirkte ebenfalls eine Aktivitätssteigerung, die in den meisten Fällen das Maß des Austausches gegen einen einfachen Methyl-Rest übertraf (siehe Tab. 14-1). Es wurden  $IC_{50}$ -Werte im unteren mikromolaren Bereich bestimmt.

Wurde auch der zweite Chlorido-Ligand gegen einen Phenylalkynyl-Ligand ausgetauscht, so wurden die symmetrischen Dialkynyl-Verbindungen (Serie I) erhalten. Die Komplexe dieser Serie zeigten eine gesteigerte antiproliferative Aktivität im submik-

romolaren Bereich. Die höchste Aktivität wurde für den Dialkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(3\text{Me})\text{Ph})_2]$  gemessen ( $\text{IC}_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ ). Das entspricht einer über 100-fachen Aktivität des Cisplatin.

**Tab. 14-1:  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Platin-Alkynyl-Komplexe (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz) in drei verschiedenen Zelllinien. (MW  $\pm$  Stabw., n = 1-5)**

Substanz	HT-29 ( $\mu\text{M}$ )	MCF-7 ( $\mu\text{M}$ )	L-929 ( $\mu\text{M}$ )
<b>Cisplatin</b>	$8,5 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})\text{Cl}_2]</math></b>	> 100 [46]	> 100 [46]	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})\text{Cl}]</math></b>	$8,3 \pm 3,0$ [46]	$11,2 \pm 1,4$ [46]	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CCPh})_2]</math></b>	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(2\text{NO}_2)\text{Ph})_2]</math></b>	$0,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})_2]</math></b>	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{NO}_2)\text{Ph})_2]</math></b>	14,9	8,2	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(2\text{Me})\text{Ph})_2]</math></b>	$0,5 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,1$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(3\text{Me})\text{Ph})_2]</math></b>	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})_2]</math></b>	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$	0,2
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]</math></b>	$0,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{F})\text{Ph})_2]</math></b>	$0,4 \pm 0,1$	< 0,3	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}2\text{Py})_2]</math></b>	0,3	$0,2 \pm 0,1$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(2\text{NO}_2)\text{Ph})]</math></b>	$15,6 \pm 5,2$	$9,1 \pm 3,9$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})]</math></b>	$2,9 \pm 1,2$	$1,6 \pm 0,3$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{NO}_2)\text{Ph})]</math></b>	$2,3 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,6$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(3\text{Me})\text{Ph})]</math></b>	$3,2 \pm 1,5$	$5,0 \pm 0,8$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]</math></b>	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,7$
<b><math>[\text{P}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]</math></b>	$10,8 \pm 3,1$	$6,8 \pm 1,1$	$8,6 \pm 0,6$
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{F})\text{Ph})]</math></b>	$4,6 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,7$	-
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}2\text{Py})]</math></b>	$29,0 \pm 7,2$	$17,6 \pm 8,2$	-

Betrachtet man die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte der Platin-Alkynyl-Komplexe einmal genauer und bringt sie in Zusammenhang mit der Molekülstruktur, so lassen sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen formulieren. Besonders interessant ist die Tatsache, dass die Dialkynyl-Komplexe (Serie I) mit wenigen Ausnahmen aktiver waren als ihre unsymmetrischen Methyl-substituierten Derivate (Serie II). Eine Ausnahme bildeten die *p*-Methyl- und *p*-Nitro-substituierten Dialkynyl-Derivate. Hier könnte die instabilere Platin-Alkin-Bindung die Ursache sein [226]. Die Platin-Methyl-Bindung ist wesentlich stabiler und im Hinblick auf die Zytotoxizität benachteiligt. Ein weiterer Ansatzpunkt für die Erklärung der unterschiedlichen antiproliferativen Effekte der Serie I und II könnte die unterschiedliche räumliche Orientierung der Komplexe sein. In der Serie I stehen die Phenylalkynyl-Koliganden in einem  $90^\circ$  Winkel zueinander, was in der Serie II nicht der Fall ist [226].

Es wurden ebenfalls die Substituenteneinflüsse am aromatischen System des Koliganden untersucht. Dazu wurden Methyl- und Nitro-Gruppen jeweils in *o*, *m*, *p*-Position des Aromaten eingeführt. In der Serie I hatte die Position des Methyl-Substituenten offensichtlich keinen Einfluss auf die Zytotoxizität des Komplexes (siehe Tab. 14-1). Für den Nitro-Substituenten war die Position 4 im Hinblick auf die erzielten  $IC_{50}$ -Werte benachteiligt. Außerdem wurden noch ein *p*-Methoxy und *p*-Fluorid-substituierter Komplex getestet. Diese zeigten mit unter  $1\ \mu M$  vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte. Auch für den Pyridin-substituierten Komplex  $[Pt(cod)(CC2Py)_2]$  wurde ein ähnlicher Wert bestimmt.

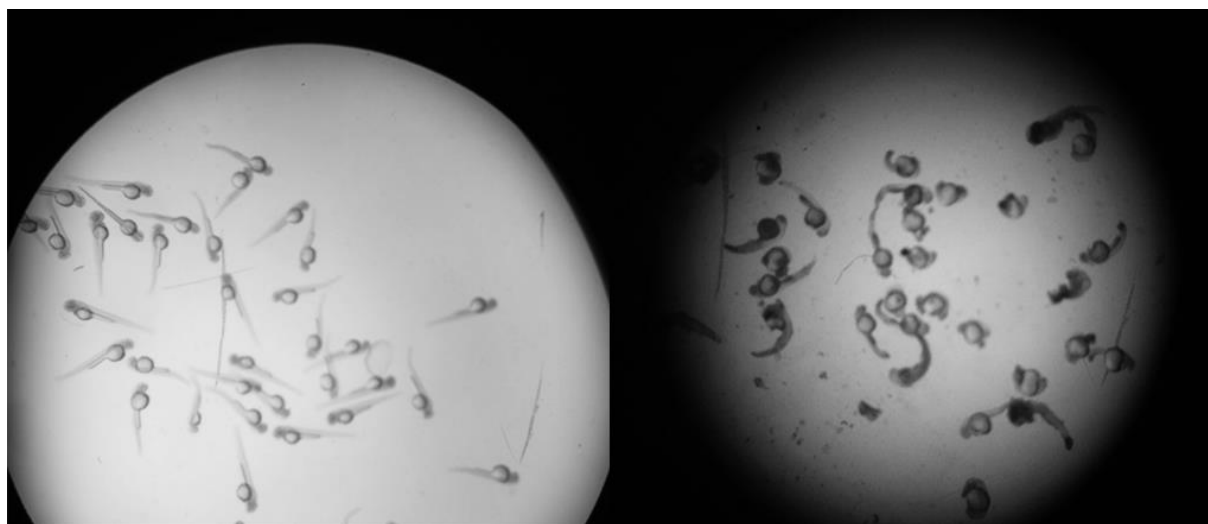
In der Serie II wurden für die Methyl- und Nitro-substituierten Komplexe unterschiedliche  $IC_{50}$ -Werte berechnet. Der aktivste Komplex ist der *p*-Methyl-substituierte Komplex  $[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]$ , der mit einem  $IC_{50}$ -Wert von circa  $0,2\ \mu M$  sogar noch aktiver ist als sein symmetrisches Dialkynyl-Derivat  $[Pt(cod)(CC(4Me)Ph)_2]$ . Die geringste Aktivität konnte für den Pyridin-substituierten Komplex  $[Pt(cod)(Me)(CC2Py)]$  gefunden werden.

Für je zwei ausgewählte Platin-Alkin-Komplexe der Serie I und II sowie für Cisplatin wurde die Zytotoxizität auch in gesunden Zellen bestimmt (siehe Tab. 14-1). Sie lagen in derselben Größenordnung wie die  $IC_{50}$ -Werte in Tumorzellen mit Ausnahme des Komplexes  $[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]$  für den 10-fach höhere Werte in L-929 Zellen bestimmt wurden. Dieses Ergebnis spricht für eine eher unselektive Wirkung der Platinkomplexe und ist durch weitere Untersuchungen genauer abzuklären.

Die unterschiedlichen Zytotoxizitäten der Serie I und II könnten auf die unterschiedlichen elektronischen Effekte der Substituenten und ihre unterschiedlichen Reaktivitäten mit möglichen biologischen Targets, z.B. DNA, zurückgeführt werden. Auch ein unterschiedliches Zellaufnahmeverhalten der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe wäre denkbar. Zur weiteren Aufklärung der Ursache für die unterschiedliche antiproliferative Aktivität der Platin-Alkynyl-Komplexe in Tumorzellen, sind daher weitere biologische Untersuchungen durchgeführt worden.

## 14.2 Toxizität im Zebrafischmodell

Der Zebrafisch dient als Modellorganismus für ein erstes präklinisches Screening neuer Arzneistoffe auf toxische Effekte im Organismus (siehe 5.2). In einer ersten *in vivo*-Studie sollten die Toxizitäten von Platin-Alkynyl-Komplexen auf den Gesamtorganismus und die embryonale Entwicklung untersucht werden, da es bisher keine Daten darüber gibt. Einen Tag alte Zebrafischembryos wurden dazu mit verschiedenen Konzentrationen der Platinkomplexe inkubiert und nach definierten Zeitpunkten auf toxische Effekte wie fehlender Herzschlag und Mißbildungen (s.u.) mikroskopisch untersucht. Aus den erhaltenen Daten konnte in Einzelfällen ein LC<sub>50</sub>-Wert berechnet werden (für eine genaue Versuchsbeschreibung siehe 20.4).



**Abb. 14-1: Mikroskopische Aufnahmen von Zebrafischembryos (links: Kontrolle, rechts: toxische Effekte sichtbar nach Inkubation mit [Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)])**



Cisplatin zeigt eine nur geringe Toxizität mit über 90 % der Embryos, die eine 2-tägige Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  überlebten (siehe Tab. 14-2). Auch bei höheren Inkubationskonzentrationen und -zeiten waren keine stärkeren toxischen Effekte sichtbar. Eine Inkubation mit den Platinkomplexen der Serie I wurde ebenfalls bis auf eine Ausnahme gut toleriert. Die entsprechenden Derivate der Serie II zeigten dagegen starke toxische Effekte, da kein Zebrafischembryo eine 2-tägige Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  überlebte. In Abb. 14-1 sind mikroskopische Aufnahmen der Zebrafischembryos dargestellt. Die durch die Platin-Alkynyl-Komplexe verursachten toxischen Effekte (Abb. 14-1 rechts) sind in erster Linie in einer Missbildung der Embryos, fehlendem Herzschlag und letztendlich vollständigem Zerfall in einzelne Fragmente mikroskopisch zu erkennen.

**Tab. 14-2: Lebende Embryos nach 2-tägiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Platinkomplex (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz). (MW  $\pm$  Stabw., n = 2-3)**

Substanz	Lebende Embryos (%)
<b>Cisplatin</b>	91,8 $\pm$ 5,4
<b>[Pt(cod)(CC(3NO<sub>2</sub>)Ph)<sub>2</sub>]</b>	76,3 $\pm$ 9,7
<b>[Pt(cod)(CC(4Me)Ph)<sub>2</sub>]</b>	87,0 $\pm$ 11,7
<b>[Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>]</b>	0
<b>[Pt(cod)(CCPy)<sub>2</sub>]</b>	93,7 $\pm$ 1,9
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(3NO<sub>2</sub>)Ph)]</b>	0
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]</b>	0
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4OMe)Ph)]</b>	0

Aus den erhaltenen experimentellen Daten ließ sich ähnlich den IC<sub>50</sub>-Werten in Tumorzellen ein LC<sub>50</sub>-Wert in Zebrafischembryos berechnen. Dazu wurden die lebenden Embryos in Prozent gegen die Komplexkonzentration aufgetragen (siehe Abb. 14-2). Diejenige Konzentration, bei der 50 % aller Embryos starben, entspricht dem LC<sub>50</sub>-Wert, welcher an der x-Achse abgelesen werden kann (siehe 20.4).

Für die bis zur höchsten Testkonzentration nur geringfügig toxischen Platinkomplexe Cisplatin,  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})_2]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CCPy})_2]$  konnte kein  $\text{LC}_{50}$ -Wert berechnet werden. Für die anderen untersuchten Komplexe sind die berechneten  $\text{LC}_{50}$ -Werte in Gegenüberstellung mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten in Tumorzellen in Tab. 14-3 gelistet. Der *m*-Nitro- und *p*-Methoxy-substituierte Komplex der Serie II zeigten im Zebrafischembryo eine mit in Tumorzellen vergleichbare Toxizität. Für den Dialkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$  sowie den Alkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$  konnte im Zebrafischembryo eine circa 10- bzw. 20-fach geringere Toxizität gefunden werden.

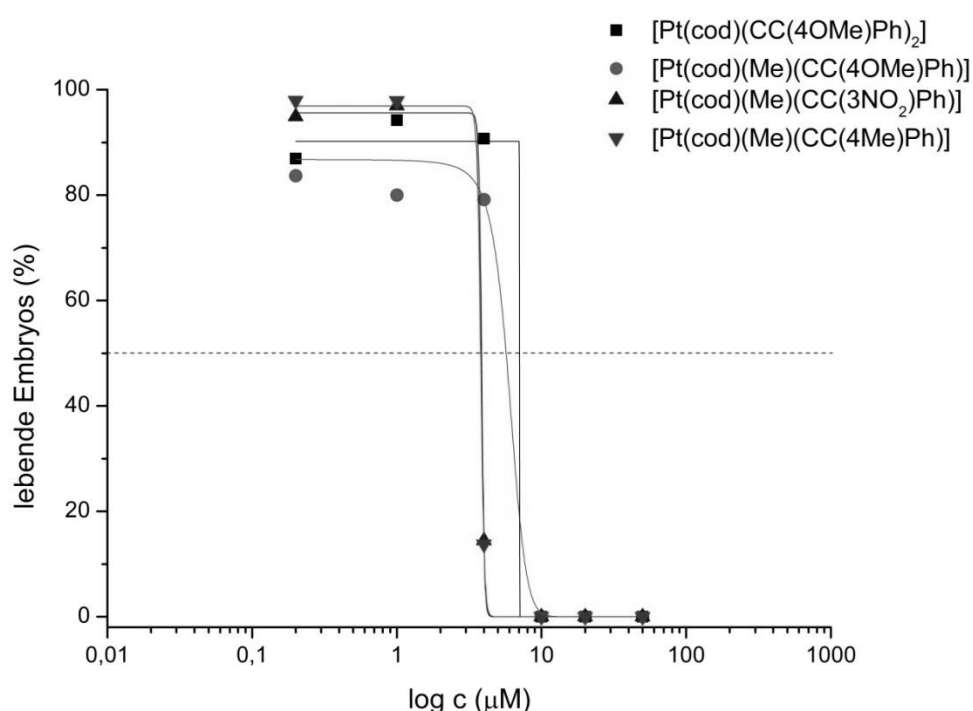


Abb. 14-2: Dosis-Wirkungskurve von Platin-Alkynyl-Komplexen. (MW, n=2)

Im Hinblick auf die therapeutische Breite der Platin-Alkynyl-Komplexe als potentielle Antitumorwirkstoffe liessen sich nach Formel 14-1 folgende Beobachtungen formulieren:

- Die untersuchten Dialkynyl-Komplexe (Serie I) besitzen eine größere therapeutische Breite als die untersuchten Methyl-substituierten Derivate (Serie II). (Mit Ausnahme der *p*-Methoxy-substituierten Platinkomplexe, die in beiden Fällen eine Toxizität im Zebrafischembryo zeigten.)

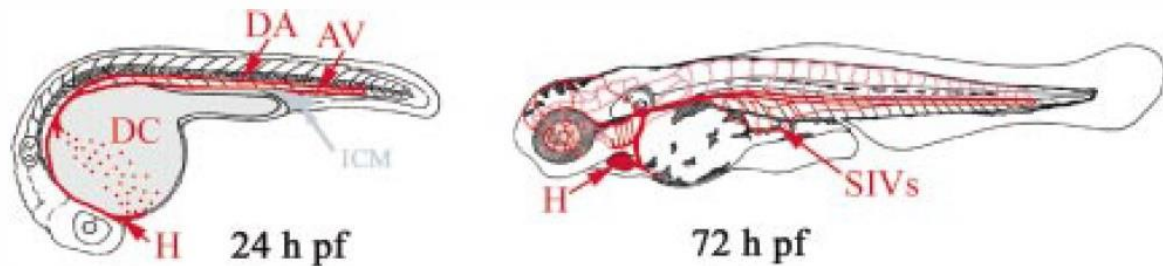
- Innerhalb der Serie II waren die therapeutischen Breiten des *m*-Nitro und *p*-Methoxy-substituierten Platinkomplexes sehr gering, wohingegen die des *p*-Methyl-Derivates durchaus akzeptabel war.

Demnach folgt die Substanzklasse der Platin-Alkynyl-Komplexe betreffend der Toxizität und therapeutischen Breite keinem einheitlichen Schema. Sie ist abhängig von der Komplexgeometrie bzw. -stabilität (Serie I vs. Serie II) und den Substituenten am Phenylacetyl-Liganden.

**Tab. 14-3: LC<sub>50</sub>-Werte im Zebrafischembryo und IC<sub>50</sub>-Werte in HT-29 Zellen ausgewählter Platin-Alkynyl-Komplexe (blau: Serie I, grün: Serie II). (MW, n = 2-5)**

Substanz	LC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
[Pt(cod)(CC(4OMe)Ph) <sub>2</sub> ]	7,1	0,6
[Pt(cod)(Me)(CC(3NO <sub>2</sub> )Ph)]	3,9	2,9
[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]	3,8	0,2
[Pt(cod)(Me)(CC(4OMe)Ph)]	5,7	10,8

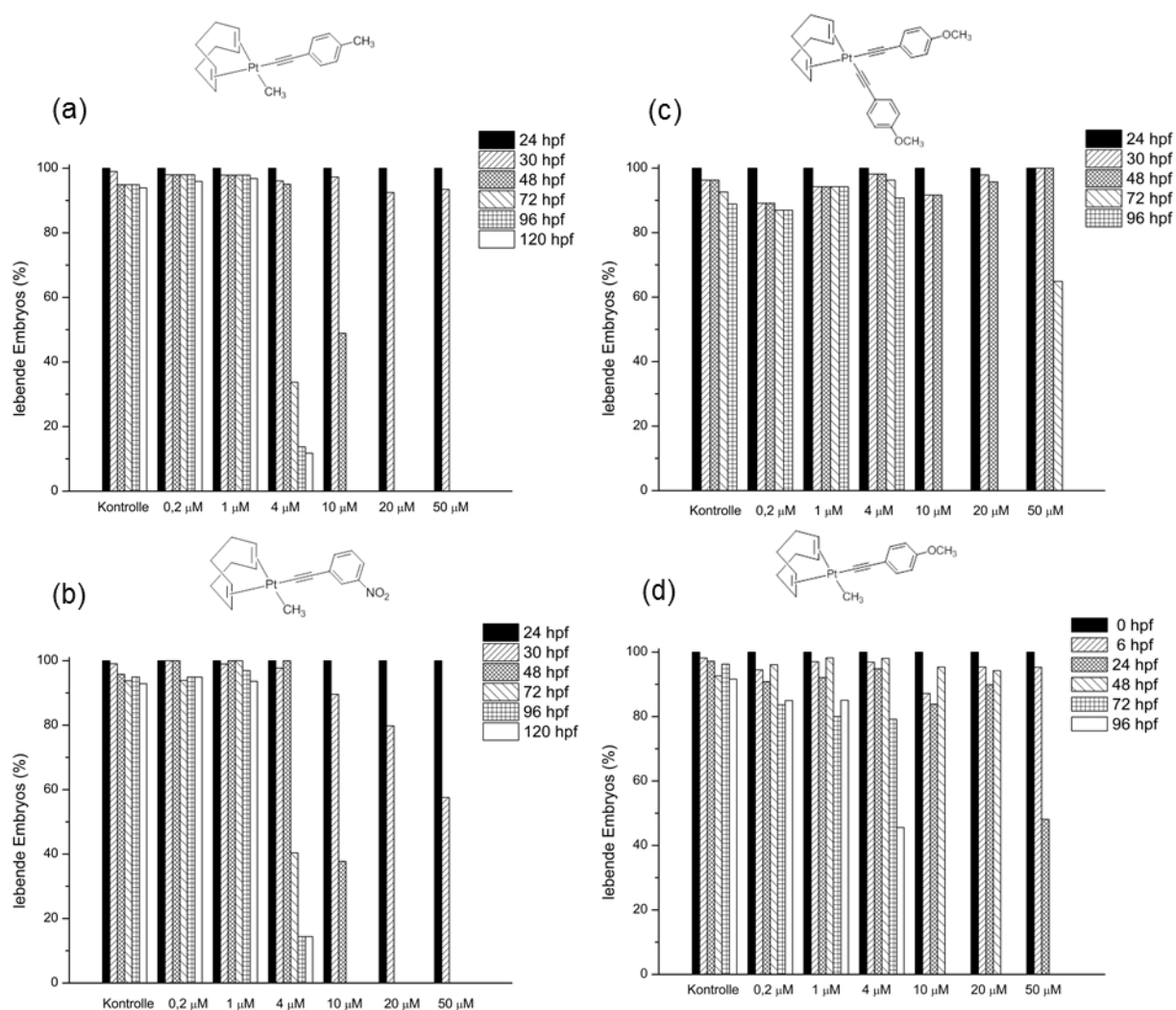
In Abb. 14-4 ist die *in vivo*-Toxizität der im Zebrafischembryo toxischen Platin-Alkynyl-Komplexe in einer konzentrations- und zeitabhängigen Darstellung vergleichend zu sehen. Besonders interessant ist an dieser Darstellungsweise, dass die Platinkomplexe auch bei Verwendung hoher Konzentrationen über einen kurzen Inkubationszeitraum (< 24 Stunden = 48 hpf) gut toleriert werden. Erst bei längeren Inkubationszeiten können toxische Effekte beobachtet werden. Insbesondere bei den *p*-Methoxy-substituierten Derivaten kommt es zu einem plötzlichen und drastischem Absterben der Zebrafischembryos, das sich in 100 % lebenden Embryos nach einem Tag (48 hpf) im Vergleich zu 0 % lebenden Embryos nach zwei Tagen (72 hpf) äußerte (siehe Abb. 14-4 (c) und (d)). Im Zeitraum 23 hpf bis 72 hpf findet beim Zebrafischembryo die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen, die sog. Angiogenese, aus der Aorta und den Bauchvenen, die zu diesem Zeitpunkt schon vollständig entwickelt sind, statt (siehe Abb. 14-3) [133, 228].



**Abb. 14-3: Entwicklung der Blutgefäße im Zebrafischembryo [228] (links: 24 hpf sind die Aorta (DA) und Bauchvenen (AV) ausgebildet, die Blutzirkulation erfolgt im Dottersack über die Kardinalvenen (DC), rechts: 72 hpf hat sich das Blutgefäßsystem vollständig ausgebildet inklusive der subintestinalen Gefäße (SIVs)). (H = Herz)**

Möglicherweise besitzen die Platin-Alkynyl-Komplexe der Serie II antiangiogene Eigenschaften, die zu einer Fehlbildung des vaskulären Systems und damit zum Tod der Zebrafischembryos führen. Für Gold-Alkynyl-Komplexe wurde von Meyer *et al.* bereits ein signifikanter Einfluss auf die Blutgefäßbildung der Zebrafischembryos nachgewiesen [53]. Zur weiteren Abklärung möglicher antiangiogener Eigenschaften der Platin-Alkynyl-Komplexe sind weiterführende Experimente mit transgenen Zebrafischembryos, die fluoreszierende Endothelzellen besitzen, indiziert.

Möglicherweise spielt auch die Aufnahme der Komplexe in den Zebrafisch eine entscheidende Rolle für dessen Toxizität. Auch eine verzögerte einsetzende Wirkung bzw. Toxizität ist denkbar.



**Abb. 14-4:** *In vivo*-Toxizität von 0,2-50 µM (a)  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4Me})\text{Ph})]$ , (b)  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{3NO}_2)\text{Ph})]$ , (c)  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})_2]$  und (d)  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})]$  in 24-120 hpf Zebrafischembryos. (MW, n = 1-2)

### 14.3 Zusammenfassung

Die untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe zeigten unterschiedliche *in vivo*-Toxizitäten im Zebrafischembryo, die im Falle der Serie II stärker ausgeprägt waren als für die Serie I und Cisplatin. Eine besonders starke Toxizität haben die 4-Methoxy-substituierten Derivate, da für  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})_2]$  als auch für  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(\text{4OMe})\text{Ph})]$  ein  $\text{LC}_{50}$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich berechnet werden konnte. Die Unterschiede in der Toxizität der Komplexe könnten auf die unterschiedlichen elektronische Struktur und Symmetrie zurückgeführt werden. Möglicherweise sind diese Eigenschaften relevant für die Aufnahme und Verteilung im Zebrafischembryo.

## 15. Zellaufnahmeuntersuchungen

Die zugelassenen Platinkomplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin müssen Zellmembranen überwinden um in die Zelle aufgenommen zu werden, im Zellkern zu akkumulieren und dort mit der DNA zu interagieren. Die Zellaufnahme ist nach der Bioverteilung der erste Schritt für die Wirksamkeit der Platinkomplexe (siehe Kapitel 3) und mitverantwortlich für die inhibitorischen Effekte auf das Tumorwachstum. Malinge *et al.* berichteten, dass 1 % der intrazellulären Platinkonzentration die für die Wirksamkeit relevanten DNA-Addukte bilden [229]. Hohe intrazelluläre Platinkonzentrationen sind notwendig für eine ausreichende Toxizität. Die Zellaufnahme spielt außerdem eine Rolle für Resistenzmechanismen. Eine verminderte zelluläre Akkumulation ist eine der Ursachen für die auftretenden Cisplatin-Resistenzen [41, 230–233].

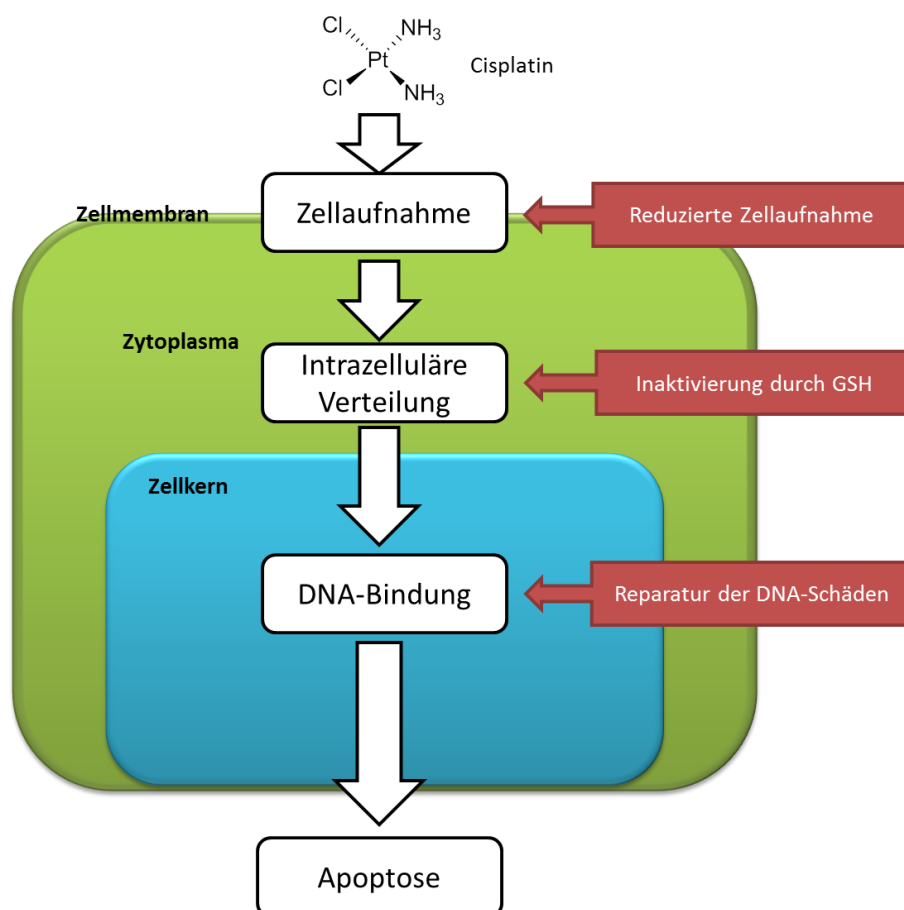


Abb. 15-1: Schema der relevanten Cisplatin-Resistenzmechanismen (GSH = Glutathion)

Die bisher beschriebenen Resistenzmechanismen lassen sich in zwei Gruppen einteilen (siehe Abb. 15-1):

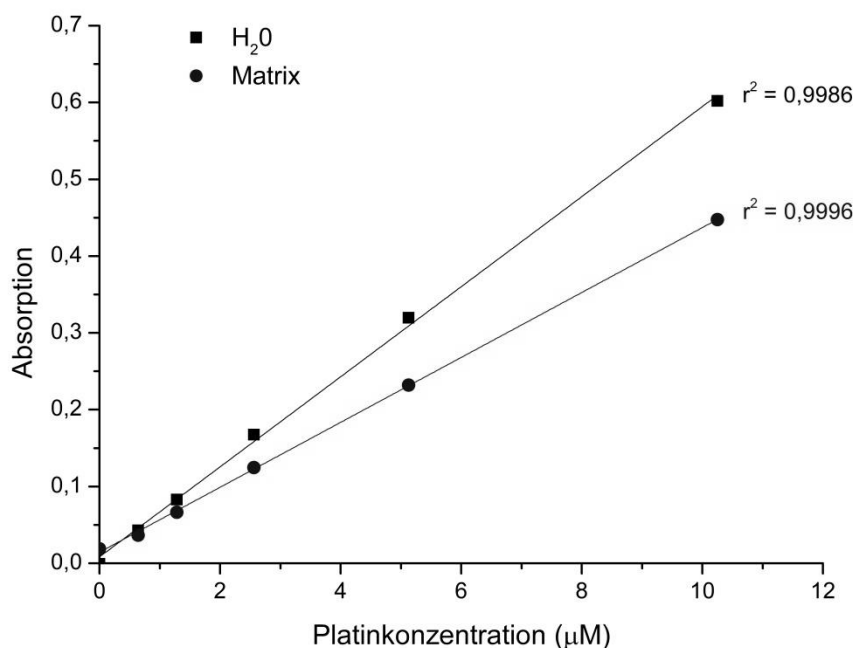
- Mechanismen, die Cisplatin daran hindern das Target, die DNA, zu erreichen und
- Mechanismen, die die Apoptose nach Bildung der DNA-Addukte verhindern [231, 233–235].

Auf letzteres wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Die Mechanismen, die Cisplatin daran hindern den Zellkern zu erreichen sind zum einen die reduzierte Zellaufnahme und zum anderen die Inaktivierung durch Glutathion in der Zelle. Zur Untersuchung der Zellaufnahme der Platin-Alkynyl-Komplexe wurde eine Methode zur Quantifizierung der zellulären Platinkonzentration benötigt. Metallkonzentration lassen sich gut mit der Atomabsorptionsspektrometrie bestimmen (siehe Kapitel 6). Für Cisplatin wird eine Zellaufnahme über passive Diffusion angenommen, aber auch Transportprozesse über Transporter, z.B. Kupfertransporter, werden diskutiert [218–220]. In Cisplatin-resistenten Zelllinien konnten Martelli *et al.* eine zelluläre Akkumulation von Platinkomplexen finden, die abhängig von der Lipophilie des Komplexes war [236]. Deshalb könnte die Lipophilie der Platinkomplexe ein Ansatzpunkt für das Überwinden von Cisplatin-Resistenzen sein. Auch Platts *et al.* fanden eine Korrelation zwischen der Lipophilie der Liganden und der zellulären Platinkonzentration [237]. Je nach Substitutionsmuster handelt es sich bei den Platin-Alkynyl-Komplexen aufgrund des *cod*-Liganden und der Phenylacetylid-Koliganden um eher lipophile Komplexe.

Interessant war außerdem die Frage, ob die Zellaufnahme direkt mit der Zytotoxizität der Platin-Alkynyl-Komplexe korreliert. Für Cisplatin wurde von Shirazi *et al.* von einem Zusammenhang der intrazellulären Platinkonzentration und der antiproliferativen Aktivität berichtet [238]. Andere Studien widerlegen diese These jedoch [232]. Beim Toxizitätsscreening im Zebrafischembryo wurde für einige Platin-Alkynyl-Komplexe eine erhöhte Letalität der Zebrafischembryos bei längeren Inkubationszeiten festgestellt (siehe 14.2). Die zeitabhängige Quantifizierung der Platinkomplexe in Tumorzellen soll klären, ob sich die Platin-Alkynyl-Komplexe möglicherweise verzögert in der Zelle anreichern. (Auch wenn diese Ergebnisse sich nicht direkt ohne weiteres vom Tumorzellmodell auf den Zebrafischembryo als Gesamtorganismus übertragen lassen.)

## 15.1 Platinquantifizierung

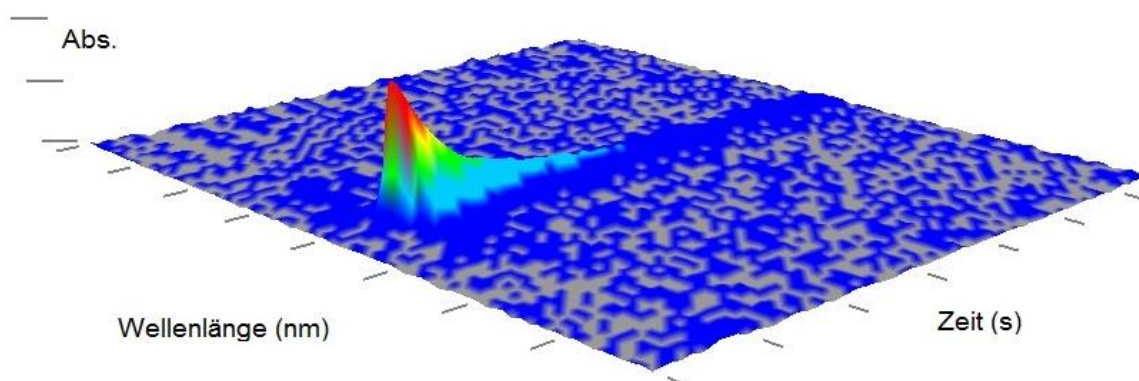
Für die Quantifizierung der Platinkomplexe in biologischem Material ist eine sensitive analytische Methode notwendig. Minami *et al.* berichteten über die Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) als geeignete analytische Techniken für die Platinquantifizierung [239]. Einhäuser *et al.* benutzten die ICP-OES sowie die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS, siehe Kapitel 6) für die Bestimmung von Platin in Proteinfractionen [240]. Für die Quantifizierung der Zellaufnahme der Platinkomplexe wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weiterentwickelte Technik der AAS, die hochauflösende AAS mit Kontinuumsstrahler (HR-CS AAS, siehe Kapitel 6) verwendet, da diese Technik auch eine empfindliche Bestimmung in komplizierten Matrices ermöglicht. Dazu wurde auf das vorinstallierte Temperatur-/Zeitprogramm auf dem contrAA® 700 (Analytik Jena) zurückgegriffen. Für eine sichere Entfernung sämtlichen Lösemittel und organischer Bestandteile wurden zusätzlich die Trocknungsschritte aus einer publizierten Methode übernommen und durch Beobachtung mittels der Ofenkamera angepasst [184]. Das optimierte Temperatur-/Zeitprogramm ist im Abschnitt Material und Methoden in Tab. 20-5 dargestellt.



**Abb. 15-2: Einfluss der Matrixproteinkonzentration ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) auf die Signalintensität von Platin-Standardlösungen. (MW,  $n = 1$ )**



Außerdem wurde der Einfluss von Zellbestandteilen (Matrix) auf das Absorptionssignal genauer untersucht, da aus der Literatur bekannt ist, dass die Proteinkonzentration der Probe einen Einfluss auf die Intensität des HR-CS AAS-Messsignals haben kann [183–185]. Dazu wurde eine Messreihe mit verschiedenen Platinkonzentrationen in wässrigen Lösungen sowie in proteinhaltigen Lösungen durchgeführt (siehe Abb. 15-2). Als Matrix wurde eine Zellsuspension mit einer Proteinkonzentration von 1,1 mg/mL verwendet. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  stellt ein Maß für die Linearität der Kalibrierfunktion dar. Dieser war für die erhaltenen Funktionen mit  $r^2 > 0,99$  sowohl in den wässrigen als auch in proteinhaltigen Proben gut. Im Vergleich zu den wässrigen Proben waren die gemessenen Absorptionswerte der proteinhaltigen Proben bei gleichen Platinkonzentrationen reduziert. Die Ausprägung dieses Effekts stieg mit höheren Platinkonzentrationen. Die Anwesenheit von Matrixbestandteilen war damit relevant und führte zu einer Abschwächung des Messsignals.



**Abb. 15-3: 3D-HR CS-AAS Signal eines Platinstandards ( $c = 250 \mu\text{g/L}$ ) in biologischem Material (Proteinkonzentration = 1 mg/mL)**

Zellen unterliegen in ihrer Proteinkonzentration einer natürlichen Schwankung. Daher wurden für die Zellaufnahmeuntersuchungen die Proteinkonzentration der Proben stets auf denselben Wert durch Verdünnung angepasst, um Messfehler, die durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen der Proben verursacht werden und fälschlicherweise zu höheren bzw. niedrigeren Platinkonzentrationen in den Proben führen, zu vermeiden. Die weitere Probenvorbereitung ist unter 20.2.3 detailliert beschrieben. Für eine Stabilisierung der Suspension wurde jeder Probe 10 % (v/v) Triton®-

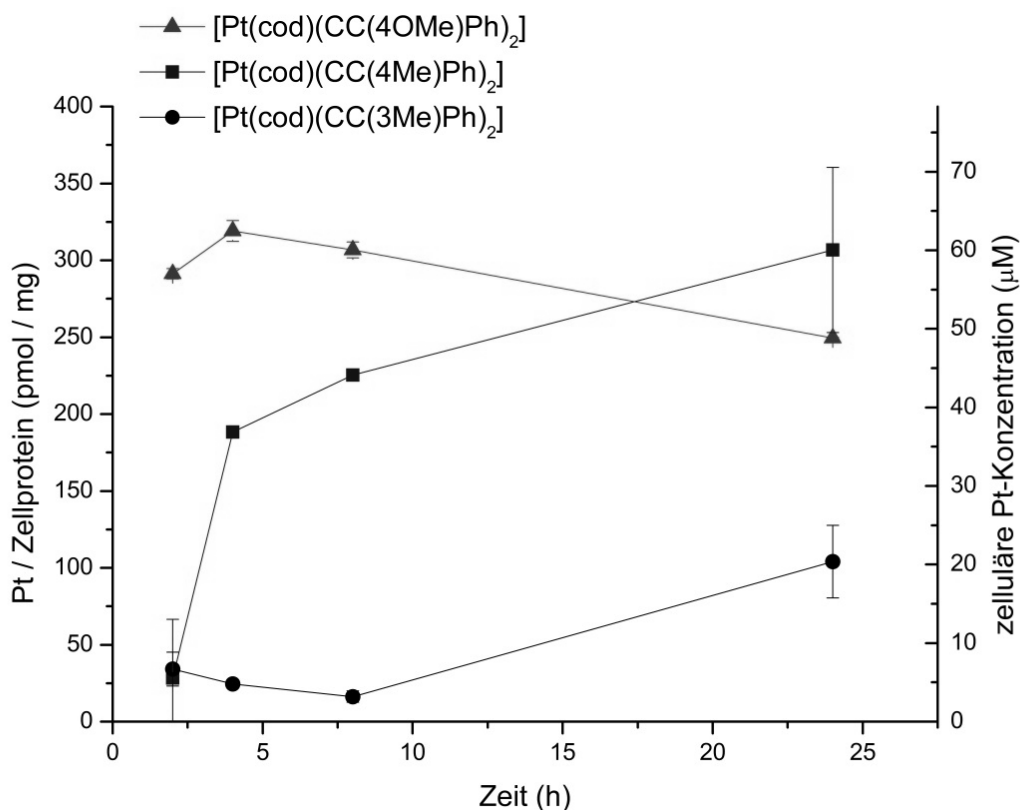
X100 1 % und 5 % (v/v) HNO<sub>3</sub> 13 % zugesetzt. Das erhaltene 3D-Messsignal in einer Proteinmatrix (c = 1 mg/mL) ist in Abb. 15-3 beispielhaft von einer Platin-Standardlösung dargestellt. Das Signal ist gekennzeichnet durch einen verzögerten, steilen Anstieg, der langsam abfällt.

## 15.2 Akkumulation von Platin-Alkynyl-Komplexen in Tumorzellen

Die Zellaufnahme ausgewählter Platin-Alkynyl-Komplexe wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Als Testkonzentrationen wurden 0,5 mikromolare Komplexlösungen gewählt, was ungefähr der Größenordnung der IC<sub>50</sub>-Werte der Komplexe in HT-29 Zellen entspricht (siehe 14.1). Jeder der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe der Serie I zeigte ein charakteristisches Zellaufnahmeverhalten (siehe Abb. 15-4). Die beiden Methyl-substituierten Dialkynyl-Komplexe [Pt(cod)(CC(3Me)Ph)<sub>2</sub>] und [Pt(cod)(CC(4Me)Ph)<sub>2</sub>], die sich nur durch die Position des Methyl-Substituenten am Phenylalkynyl-Koligand unterscheiden, konnten eine vollkommen unterschiedliche Konzentrations-Zeit-Kurve gezeichnet werden. Der an der Position 3 substituierte Dialkynyl-Komplex zeigte eine nur geringe Akkumulation in Tumorzellen mit leicht ansteigender intrazellulärer Platinkonzentration über längere Inkubationsdauer (24 Stunden). Der an der Position 4 substituierte Dialkynyl-Komplex führte bereits nach kurzer Inkubationszeit von 6 Stunden zu einer 6-fach höheren zellulären Platinkonzentration, die noch weiter Anstieg bis zu einer maximalen Platinkonzentration von 60 µM, was einer circa 120-fachen Anreicherung verglichen mit dem Extrazellulärmedium entspricht.

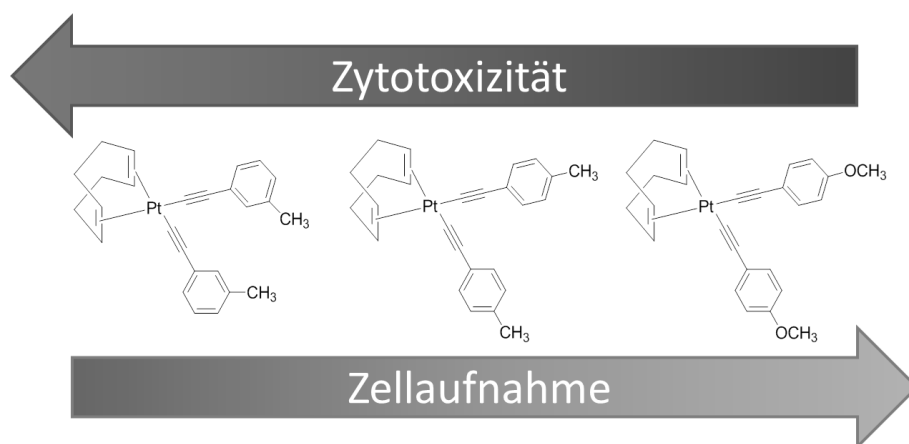
Für das Passieren von Biomembranen scheint daher der Methyl-Substituent in *para*-Position des Phenylalkynyl-Liganden vorteilhafter zu sein. Die Ursache dafür könnte die unterschiedliche räumliche Anordnung der Komplexe sein, denn chemisch unterscheiden sich die beiden Methyl-substituierten Komplexe [Pt(cod)(CC(3Me)Ph)<sub>2</sub>] und [Pt(cod)(CC(4Me)Ph)<sub>2</sub>] nicht. Der *p*-Methoxy-substituierte Dialkynyl-Komplex [Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>] zeigte schon nach kürzester Inkubationszeit (1 Stunde) mit circa 300 pmol pro mg Zellprotein eine sehr hohe Anreicherung (circa 120-fach) innerhalb der Zelle und erreichte sein Maximum nach 4-stündiger Inkubation. Bei länger andauernder Inkubation (> 4 Stunden) sank die zelluläre Platinkonzentration jedoch wieder und erreichte ein Minimum nach der maximal untersuchten Inkubations-

zeit von 24 Stunden. Die zu diesem Zeitpunkt gemessene zelluläre Platinkonzentration ist mit circa 50  $\mu\text{M}$  immer noch als hoch einzuschätzen. Abschließend lässt sich sagen, dass sich die Kinetik der Zellaufnahme des Methoxy-substituierten von den beiden Methyl-substituierten Platin-Alkynyl-Komplexen unterscheidet.



**Abb. 15-4: Zeitabhängige Akkumulation von Platin-Alkynyl-Komplexen der Serie I in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  Platinkomplex. (MW  $\pm$  Stabw., n = 2-3)**

Überraschend ist, dass die intrazelluläre Platinkonzentration der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe nicht mit der Zytotoxizität in Tumorzellen korrelierte, wie es z.B. für Cisplatin berichtet wurde [238]. Beide Parameter verhalten sich im Falle der Platin-Alkynyl-Komplexe entgegengesetzt (siehe Abb. 15-5). Mit zunehmender Zellaufnahme der Dialkynyl-Komplexe sinkt die Zytotoxizität und umgekehrt. Erwähnt sei an dieser Stelle, dass die Zellaufnahmeexperimente nur über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt wurden, wohingegen die Zytotoxizität nach 72 Stunden bestimmt wurde. Daher sind weitere Experimente mit längerer Inkubation nötig um diese Beobachtung abzusichern.



**Abb. 15-5: Korrelation der Zytotoxizität und Zellaufnahme der Platinkomplexe der Serie I**

Von Ghezzi *et al.* und anderen Arbeitsgruppen wurde für Cisplatin von einer zeitabhängigen Akkumulation in verschiedenen Tumorzelllinien berichtet [217, 241–243]. Die Zellaufnahme des Cisplatins erfolgte rasch nach kurzer Inkubationszeit und erreichte ein Plateau nach etwa 24 Stunden. Es wird vermutet, dass dieses Plateau bei längeren Inkubationszeiten durch die von Cisplatin verursachten Zellschäden, die sich u.a. in einer Fehlfunktion der Zellmembranen äußert, begründet liegt [242].

Neben den Platinkomplexen der Serie I wurde auch das Zellaufnahmeverhalten von zwei Platinkomplexen der Serie II untersucht. Dazu wurden zur besseren Vergleichbarkeit der *p*-Methyl- und *p*-Methoxy-substituierten Alkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$  ausgewählt. Die Zellaufnahme der unsymmetrischen Alkynyl-Komplexe folgte einer ähnlichen Kinetik wie die Zellaufnahme der entsprechenden Dialkynyl-Komplexe (siehe Abb. 15-6). Für  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$  konnte zu Beginn ein langsamer Anstieg, der ein Plateau nach circa 6 Stunden mit intrazellulären Platinkonzentrationen von 20–25  $\mu\text{M}$  erreichte, beobachtet werden. Der *p*-Methoxy-substituierte Komplex zeigte ebenfalls einen langsamen Anstieg zu Beginn mit einer maximalen Platinkonzentration in der Zelle von circa 45  $\mu\text{M}$ , die jedoch bei längerer Inkubationsdauer auf einen Wert von circa 30  $\mu\text{M}$  abfiel. Verglichen mit den entsprechenden Dialkynyl-Derivaten war die zelluläre Akkumulation der Alkynyl-Komplexe der Serie II stark reduziert. Das steht im Einklang mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten, die für die Serie II ebenfalls höher lagen als für die Serie I. Die stärkeren Toxizitäten der Platin-Alkynyl-Komplexe der Serie II im Zebrafischembryo ließen sich mit den Zellaufnahmeexperimenten nicht erklären.

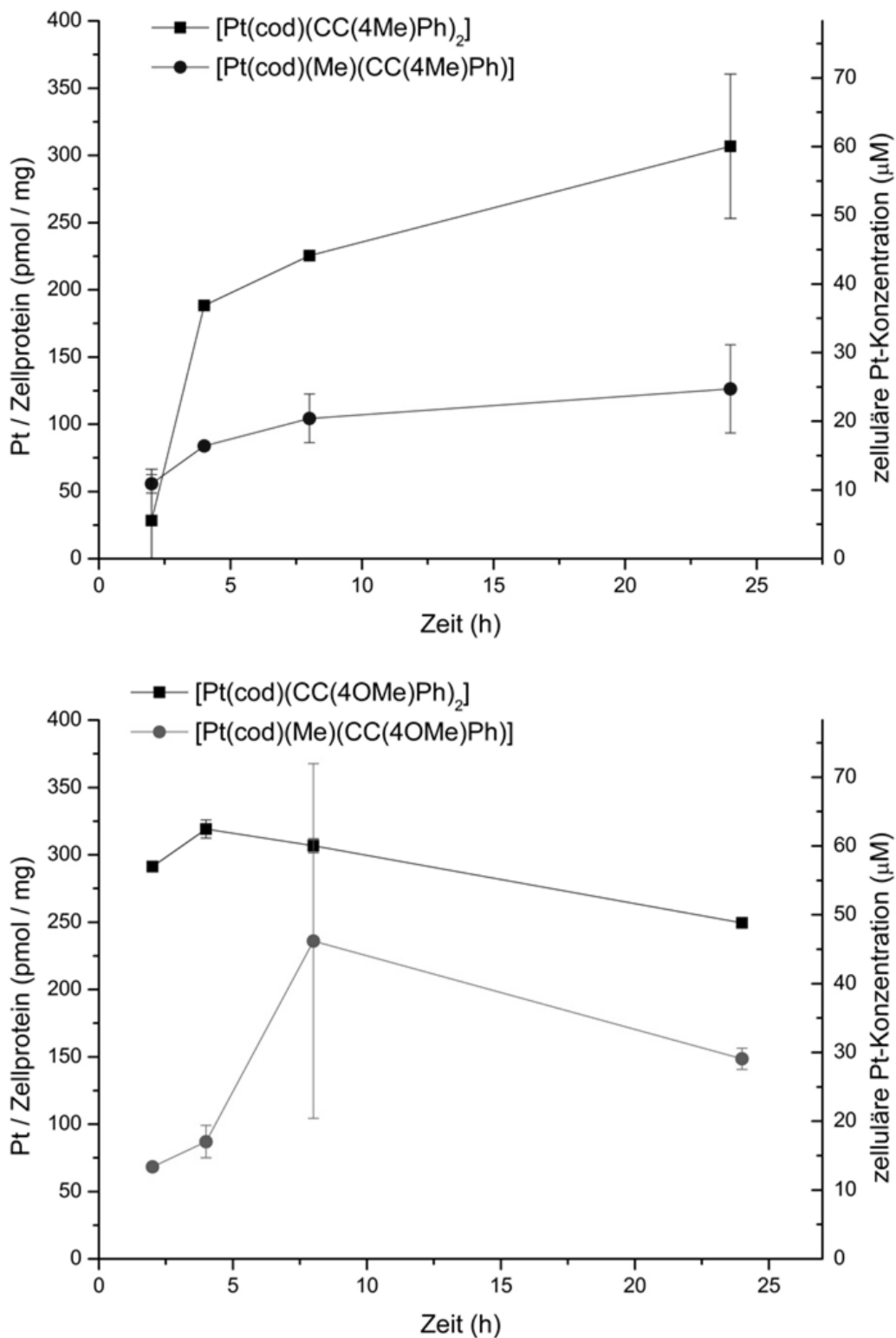


Abb. 15-6: Zeitabhängige Akkumulation der Platin-Alkynyl-Komplexe [Pt(cod)(CC(4Me)Ph)<sub>2</sub>] und [Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)] (oben) bzw. [Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>] und [Pt(cod)(Me)(CC(4OMe)Ph)] (unten) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit 0,5 μM Platinkomplex. (MW ± Stabw., n = 2-3)

### 15.3 Zusammenfassung

Cisplatin reicherte sich nach 24 Stunden etwa 7-fach in der Tumorzelle verglichen mit dem Extrazellulärmedium an [217]. Damit war die zelluläre Akkumulation der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe höher als Cisplatin und könnte die Ursache für die geringeren  $IC_{50}$ -Werte dieser Substanzfamilie sein. Innerhalb der Substanzfamilie korrelierten die  $IC_{50}$ -Werte in den Tumorzellen jedoch nicht mit dem Zellaufnahmeverhalten. Die Zellaufnahmeuntersuchungen lieferten außerdem keine Erklärung für die im Zebrafischembryo beobachtete zeitabhängige Toxizität.

## 16. Untersuchungen zur DNA-Interaktion

Die DNA ist als Target für Platinkomplexe bekannt. Mit zwei unterschiedlichen Methoden wurde die DNA-Bindung der Platin-Alkynyl-Komplexe genauer untersucht, mit Cisplatin verglichen und überprüft, ob für diese neue Substanzklasse von Platinkomplexen die DNA ebenfalls als Target in Betracht kommt.

### 16.1 DNA-Bindungsaffinität

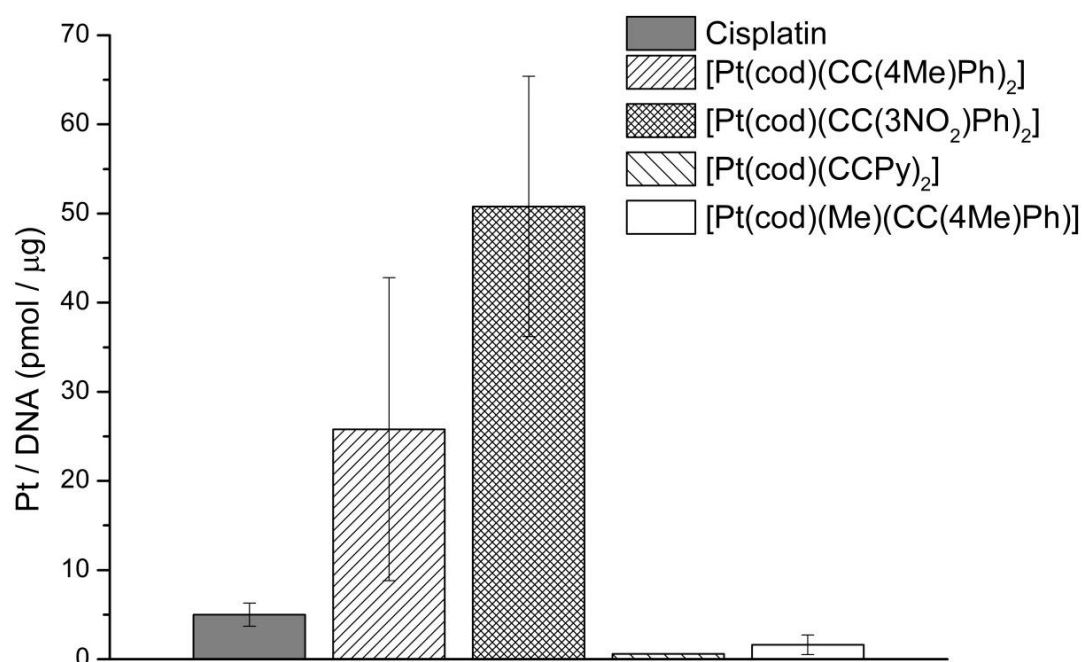
Bei der Ethanolpräzipitationsmethode handelt es sich um ein einfaches Bindungsexperiment an isolierter Lachsspermien-DNA, die mit den Platin-Alkynyl-Komplexen für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurde die DNA ausgefällt und die DNA-Konzentration mittels UV-Messung sowie die Platinkonzentration mittels Atomabsorptionsspektrometrischer Messung bestimmt. Das Verhältnis der erhaltenen Konzentrationen entsprach der Affinität der Platinkomplexe zur DNA und wurde angegeben in pmol pro µg sowie berechnet als Nukleosid/Substanz-Verhältnis (genaue Versuchsdurchführung siehe 20.6.1).

Tab. 16-1: DNA-Bindungsaffinität von Platinkomplexen. (MW ± Stabw., n = 3)

Substanz	Ti/DNA (pmol/µg)	Nukleosid/Substanz- Verhältnis
Cisplatin	5,0 ± 1,3	693 ± 181
[Pt(cod)(CC(3NO <sub>2</sub> )Ph) <sub>2</sub> ]	51 ± 15	68 ± 21
[Pt(cod)(CC(4Me)Ph) <sub>2</sub> ]	26 ± 17	163 ± 89
[Pt(cod)(CCPy) <sub>2</sub> ]	0,6 ± 0,0	5348 ± 69
[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]	1,6 ± 1,1	2597 ± 1402

Für Cisplatin konnte eine Affinität zur DNA von circa 5 pmol Platin pro µg DNA bestimmt werden. Das entspricht etwa einem Nukleosid/Substanz-Verhältnis von 700

(siehe Tab. 16-1). Dieser Wert beträgt nur etwa ein Drittel des in der Literatur gefundenen Wertes von 3000 [198]. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in dem unterschiedlichen Versuchsaufbau. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für die folgende Interpretation der Ergebnisse der selbst bestimmte Wert verwendet. Interessant ist, dass die untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe keine einheitliche Affinität zur DNA aufweisen. Je nach Alkynyl-Koligand und Symmetrie des Komplexes ergaben sich andere Bindungseigenschaften. Die höchste Affinität kann für den *m*-Nitro-substituierten Platinkomplex bestimmt werden. Sie lag etwa 10-fach über der DNA-Bindung des Cisplatin. Der untersuchte *p*-Methyl-substituierte Platin-Alkynyl-Komplex wies eine 5-fach höhere Affinität zur DNA auf als Cisplatin. Das entsprechende unsymmetrische Derivat zeigte eine stark reduzierte Bindungsaffinität von unter 1 pmol Platin, das pro  $\mu\text{g}$  DNA gebunden vorlag. Mit circa 1 pmol Platin pro  $\mu\text{g}$  DNA zeigte auch der symmetrische Platin-Alkynyl-Komplex mit Pyridin-Substituenten ein nur sehr geringes Bindungsvermögen zur DNA. Die Ergebnisse sind in Abb. 16-1 veranschaulicht in einem Balkendiagramm dargestellt.



**Abb. 16-1: Affinität ausgewählter Platinkomplexe zur DNA nach 4-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C. (MW  $\pm$  Stabw., n = 3)**

Eine Korrelation der DNA-Bindungsaffinität mit der Zytotoxizität der untersuchten Komplexe bestand nicht. Die IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Platin-Alkynyl-Komplexe la-



gen alle zwischen 0,2 und 0,4  $\mu\text{M}$ . In den Bindungseigenschaften wurden dagegen Unterschiede sichtbar. Alle untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe zeigten eine DNA-Interaktion, die für zwei der Komplexe wesentlich höher war als für Cisplatin. Die DNA ist folglich als mögliches Target dieser Substanzklasse in Betracht zu ziehen.

## 16.2 Veränderung der DNA-Schmelztemperatur

Die Aufnahme von Schmelzkurven der DNA ermöglicht es die Wechselwirkungen von Metallkomplexen mit der DNA genauer zu untersuchen. Eine Veränderung in der Schmelzkurve der DNA geht mit einer Veränderung der DNA-Stabilität einher. Die Auftrennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge führt zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur beim Absorptionsmaximum von 260 nm (siehe Abb. 16-2).

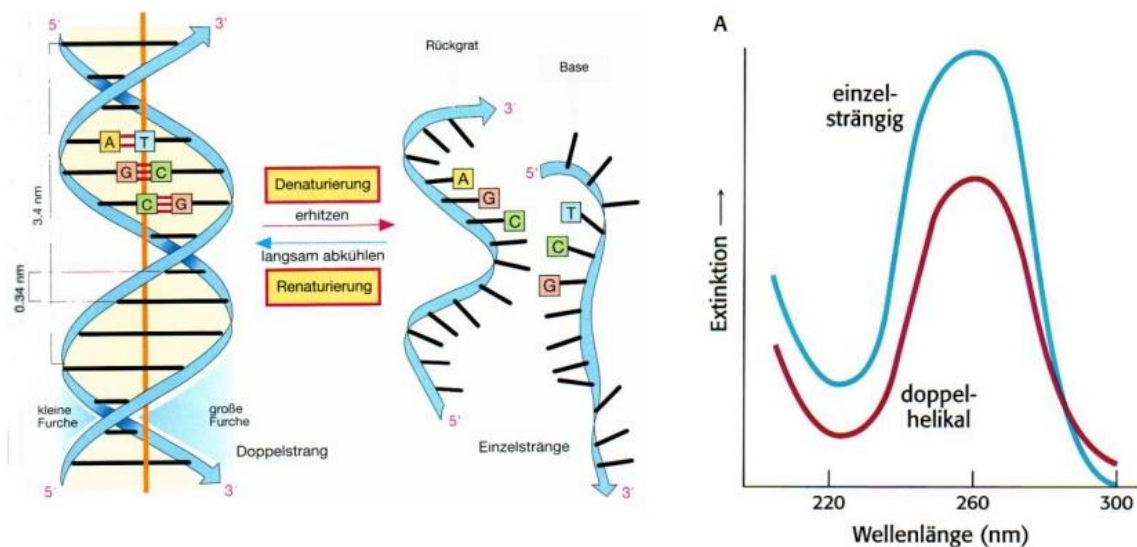
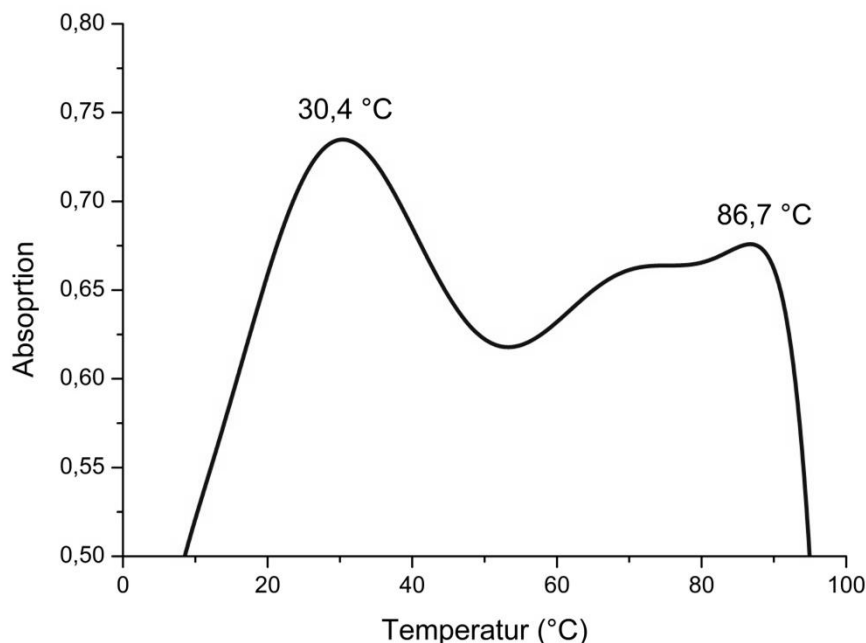


Abb. 16-2: Schmelztemperaturbestimmung von DNA [73]

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur  $T_m$  wurde die Absorption der DNA bei 260 nm gegen die Temperatur bestimmt und graphisch aufgetragen. Das lokale Maximum der Ableitungsfunktion dieser Kurve entspricht der Schmelztemperatur  $T_m$  (siehe Abb. 16-3).

Durch Inkubation der DNA mit den Platinkomplexen und schrittweiser Erhöhung der Temperatur sowie kontinuierlicher UV-Messung bei 260 nm kann der Einfluss des Komplexes auf die Schmelztemperatur bestimmt werden. Die Veränderung der DNA-Schmelztemperatur zeigt, ob die DNA durch den Komplex stabilisiert (Verschiebung zu höheren  $T_m$ -Werten) oder destabilisiert (Verschiebung zu niedrigeren  $T_m$ -Werten)

wird. Dazu wurde der erhaltene  $T_m$ -Wert mit dem  $T_m$ -Wert reiner ctDNA (Kalbsthymus-DNA, engl. *calf thymus DNA*) verglichen und der  $\Delta T_m$ -Wert berechnet (siehe 20.6.2 für eine detaillierte Versuchsbeschreibung).



**Abb. 16-3: 1. Ableitung der Funktion der Schmelzkurve von ctDNA. (MW, n = 2)**

Eine Stabilisierung der DNA spricht in der Regel für eine Interkalation des Komplexes. Für planare, aromatische Strukturen kommt neben der kovalenten Wechselwirkung mit der DNA die Interkalation in Betracht (siehe 4.1.2.2). Die antitumoraktiven Platinkomplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin interagieren mit der DNA über kovalente Bindungen. Für Platinkomplexe des Types  $[\text{Pt}(\text{A}_\text{L})-(\text{phen})](\text{ClO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  wurde aufgrund der speziellen räumlichen Struktur auch eine Interkalation nachgewiesen. Da die Platin-Alkynyl-Komplexe teils eine hohe teils eine geringe Affinität zur DNA aufweisen (siehe 16.1), sollte überprüft werden, ob möglicherweise ein anderer Bindungsmodus dafür verantwortlich ist.

Die Schmelzpunktverschiebungen ausgewählter Platin-Alkynyl-Komplexe sowie von Cisplatin sind in Tab. 16-2 gelistet. Der  $\Delta T_m$ -Wert der Platinkomplexe variierten von circa  $-10\text{ °C}$  bis  $+3\text{ °C}$ . Von einer Interkalation wird gesprochen, wenn  $\Delta T_m$  größer als  $+5\text{ °C}$  ist. Demzufolge scheint keiner der untersuchten Platinkomplexe in die DNA zu interkalieren. Für Cisplatin und zwei der Dialkynyl-Komplexe  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(\text{3NO}_2)\text{Ph})_2]$

und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$  konnte eine nur geringe Wechselwirkung mit der DNA ( $\Delta T_m < 3\text{ }^\circ\text{C}$ ) gefunden werden.

Die beiden Komplexe der Serie II  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]$  zeigten dagegen eine DNA-Schmelzpunktverschiebung von 7-10  $^\circ\text{C}$ . Interessant ist, dass der Schmelzpunkt nicht zu höheren Temperaturen, was einer DNA-Stabilisierung entsprechen würde, sondern zu niedrigeren Temperaturen verschoben wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass Cisplatin nach der Bindung an die DNA die Duplex-Struktur biegt und entspannt [244], was einer Destabilisierung der Duplex-Struktur entspricht und die Verschiebung zu geringeren  $T_m$ -Werten erklärt. Eine leichte Destabilisierung der DNA konnte auch für den Dialkynyl-Komplex  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})_2]$  beobachtet werden, was einen ähnlichen Wirkmechanismus vermuten lässt.

**Tab. 16-2: Schmelztemperaturverschiebungen ( $\Delta T_m$ ) der ctDNA nach Inkubation mit Platinkomplexlösungen. (MW, n = 2-3)**

Substanz	$\Delta T_m\text{ (}^\circ\text{C)}$
<b>Cisplatin</b>	- 1,4
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})_2]</math></b>	+ 1,1
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})_2]</math></b>	- 6,3
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]</math></b>	+ 3,1
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(3\text{NO}_2)\text{Ph})]</math></b>	- 7,3
<b><math>[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{Me})\text{Ph})]</math></b>	- 9,3

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen des DNA-Bindungsexperiments (siehe 16.1). Es wurde eine Interaktion der Platin-Alkynyl-Komplexe mit der DNA nachgewiesen. Eine genauere Charakterisierung der Bindungsart (kovalente Bindung, Interkalation etc.) war mit den erhaltenen experimentellen Daten bisher nicht eindeutig möglich.

### **16.3 Zusammenfassung**

Die Untersuchungen zur DNA-Interaktion konnten zeigen, dass die Platin-Alkynyl-Komplexe in unterschiedlichem Ausmaß und auf unterschiedliche Art und Weise in Abhängigkeit von ihrer Geometrie und Elektrophilie der Liganden mit der DNA interagieren. Eine Korrelation zur Zytotoxizität der Komplexe konnte nicht gefunden werden. Dennoch ist ein die DNA betreffender Wirkmechanismus möglich. Zur weiteren Untersuchung der Art der Wechselwirkung der Platin-Alkynyl-Komplexe mit der DNA würden sich gelelektrophoretische Messungen anbieten.

## 17. *In situ*-Inhibition von Disulfidreduktasen

Wie in Kapitel 15 beschrieben, ist die Reaktion von Cisplatin mit dem Tripeptid Glutathion einer der angenommenen Resistenzmechanismen. Glutathion besteht aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin (siehe Abb. 17-1).

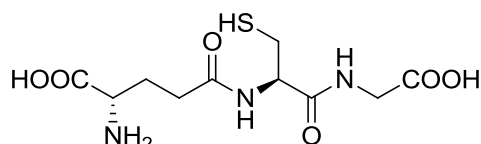


Abb. 17-1: Struktur von Glutathion

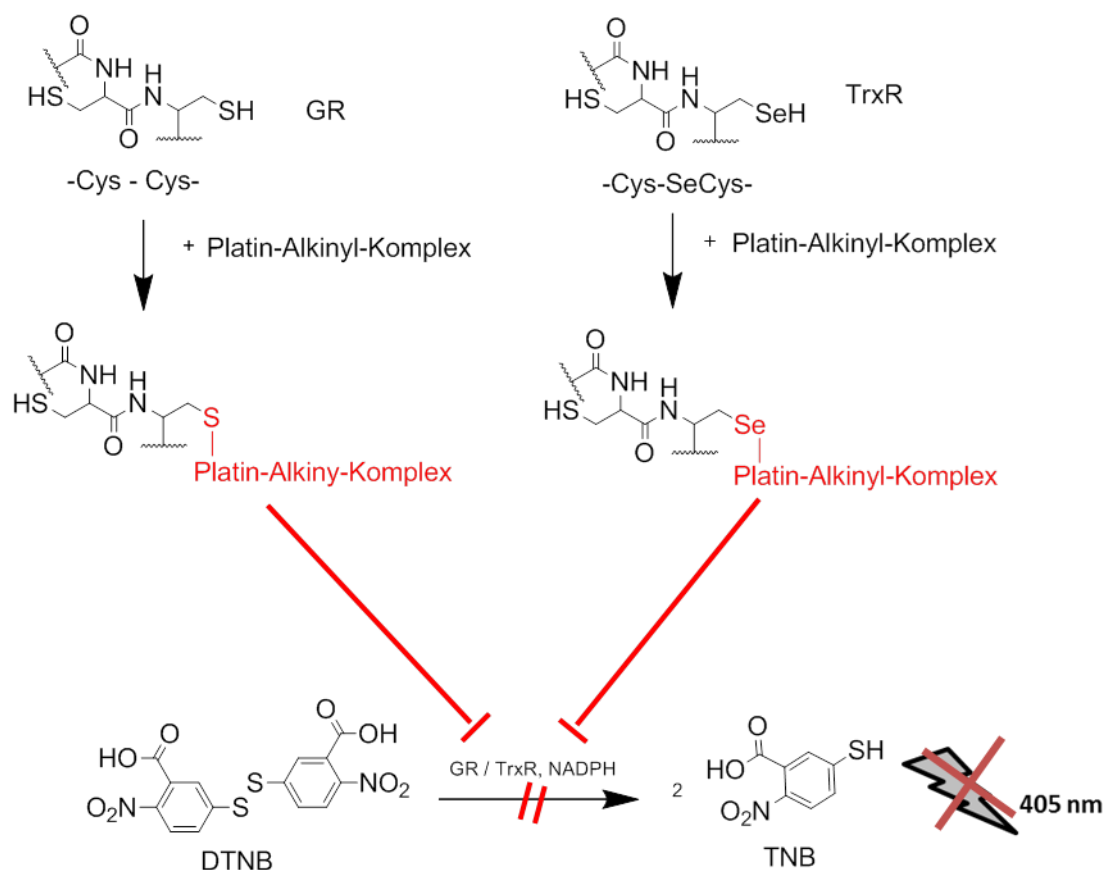
Die Eigenschaften des Glutathions als S-Donor sind durch die Thiol-Funktion der Aminosäure Cystein bedingt. Studien haben gezeigt, dass Cisplatin genau an dieses Schwefelatom koordinieren kann [245]. Dabei entstehen inaktive Konjugate, die über Exportpumpen wieder aus der Zelle transportiert werden und damit die DNA zur Wirkentfaltung im Zellkern nicht erreichen können [245]. Glutathion ist das Substrat des Enzyms Glutathionreduktase, das die Thiol-Form des Glutathions in der Zelle permanent nach dessen Reaktion mit oxidierenden Substanzen regeneriert. Die Glutathionreduktase besitzt in ihrem katalytischen Zentrum ebenfalls zwei Cysteine und damit ebenfalls Thiol-Funktionen, die als potentieller Reaktionspartner für Metallkomplexe in Betracht kommen (siehe 4.3.1).



Abb. 17-2: GR/TrxR katalysierte Umsetzung von DTNB (GR: Glutathionreduktase, TrxR: Thioredoxinreduktase, DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), TNB: 5-Thionitrobenzoesäure)

Um die mögliche Interaktion der Platin-Alkynyl-Komplexe mit Thiolen zu untersuchen, wurden photometrische Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Platin-Alkynyl-Komplexe mit den Enzymen Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase (TrxR) sowie einem möglichen Substrat des Enzyms, der 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)

(DTNB, Ellman's Reagenz), inkubiert. Die Umsetzung erfolgte unter ATP-Verbrauch in Form von NADPH und die Entstehung des Produkts 5-Thionitrobenzoesäure (TNB) wurde photometrisch bei 405 nm bestimmt (siehe Abb. 17-2). Bei einer Inhibition des Enzyms durch Koordination der Platinkomplexe an die Thiol-Funktion, ähnlich des Resistenzmechanismus von Cisplatin, konnte DTNB nicht zu TNB umgesetzt werden und es wurde keine Absorption gemessen (siehe Abb. 17-3).



**Abb. 17-3: Möglicher Mechanismus der *in situ*-Inhibition von GR bzw. TrxR (GR: Glutathionreduktase, TrxR: Thioredoxinreduktase, DTNB: 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), TNB: 5-Thionitrobenzoesäure)**

Das Enzym TrxR besitzt im Gegensatz zur GR im katalytischen Zentrum nicht nur eine Thiol-Funktion sondern zusätzlich eine Selenol-Funktion (siehe 4.3.1), die eine stärkere Redoxaktivität und Säureeigenschaften besitzt (siehe 4.2). Aufgrund der hohen Reaktivität kann die TrxR leicht mit elektrophilen Verbindungen, wie den Platinkomplexen mit elektronenreichen Alkyl- oder Alkynyl-Koliganden, reagieren. Neben einer Reaktion der Platinkomplexe mit der Thiol-Funktion, was sich in einer Hemmung beider untersuchten Enzyme erkennbar machen würde, konnte so auch untersucht werden, ob Platin-Alkynyl-Komplexe bevorzugt mit der Selenol-Funktion koordi-

nieren, wie es beispielsweise für Gold-Alkine bekannt ist [53]. Für Cisplatin beobachteten Witte *et al.* eine Inhibition der TrxR aber nicht der GR [126].

Die Auswertung des Experiments erfolgte durch Berechnung eines IC<sub>50</sub>-Wertes, der durch graphische Auftragung der Enzymaktivität gegen die verwendeten Testkonzentrationen der Platinkomplexe erhalten wurde (für eine genauere Beschreibung siehe 20.10). Der IC<sub>50</sub>-Wert entsprach dabei derjenigen Konzentration, die nötig ist, um die Enzymaktivität um 50 % zu reduzieren. Zu Vergleichszwecken wurde neben den Platin-Alkynyl-Komplexen Cisplatin als Referenz verwendet.

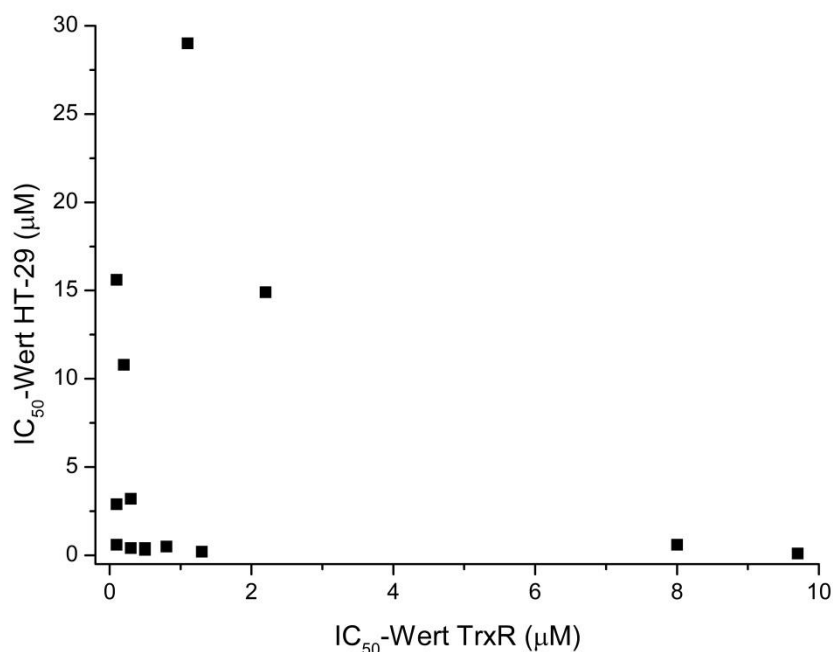
**Tab. 17-1: *In situ*-TrxR- und GR-Inhibition von Platin-Alkynyl-Komplexen ausgedrückt in IC<sub>50</sub>-Werten (blau: Serie I, grün: Serie II, grau: Referenz). (MW ± Stabw., n = 1-3)**

Substanz	TrxR (µM)	GR (µM)
<b>Cisplatin</b>	> 25	> 25
<b>[Pt(cod)(CCPh)<sub>2</sub>]</b>	0,8 ± 0,5	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(2NO<sub>2</sub>)Ph)<sub>2</sub>]</b>	< 0,1	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(3NO<sub>2</sub>)Ph)<sub>2</sub>]</b>	0,3 ± 0,2	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(4NO<sub>2</sub>)Ph)<sub>2</sub>]</b>	2,2 ± 0,3	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(3Me)Ph)<sub>2</sub>]</b>	9,7 ± 0,1	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(4Me)Ph)<sub>2</sub>]</b>	0,5 ± 0,1	> 25
<b>[Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>]</b>	8,0 ± 4,4	> 25
<b>[Pt(cod)(CC2Py)<sub>2</sub>]</b>	0,5	> 25
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(2NO<sub>2</sub>)Ph)]</b>	< 0,1	< 25
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(3NO<sub>2</sub>)Ph)]</b>	< 0,1	< 25
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(3Me)Ph)]</b>	0,3 ± 0,1	≈ 25
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]</b>	1,3 ± 0,6	> 25
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4OMe)Ph)]</b>	0,2 ± 0,1	n/a
<b>[Pt(cod)(Me)(CC2Py)]</b>	1,1	< 25

Cisplatin zeigte bis zur höchsten Testkonzentration von 25 µM keine Inhibition der Thiol-haltigen Enzyme (siehe Tab. 17-1). In der Literatur wurde von einer inhibitorischen

schen Wirkung des Cisplatin auf TrxR gesprochen, allerdings wurden hier höhere Konzentrationen oder längere Inkubationszeiten verwendet [125, 126]. Alle untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe waren dagegen potente TrxR-Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im unteren mikromolaren bzw. submikromolaren Bereich. Die stärksten Inhibitoren waren die Nitro-substituierten Platin-Alkynyl-Komplexe. Klein *et al.* führten Untersuchungen zur Redoxstabilität ausgewählter Platin-Alkynyl-Komplexe durch und konnten zeigen, dass die Nitro-substituierten Derivate als einzige dieser Substanzfamilie ein reversibles Redoxverhalten besitzen [226], was im Einklang mit weiteren Publikationen steht, die von einer Elektronenakzeptoreigenschaft ähnlich gebundener Nitro-Gruppen berichten [246]. Möglicherweise war dieses Redoxverhalten relevant für die Interaktion mit den an Redoxprozessen beteiligten Enzym TrxR (siehe 4.3).

Die Dialkynyl-Komplexe [Pt(cod)(CC(3Me)Ph)<sub>2</sub>] und [Pt(cod)(CC(4OMe)Ph)<sub>2</sub>] zeigten die geringste Enzymhemmung. Die GR wurde von den Platin-Alkynyl-Komplexen nicht gehemmt, was diese Substanzfamilie zu selektiven Thioredoxinreduktaseinhibitoren macht.



**Abb. 17-4: Korrelation der Zytotoxizität (IC<sub>50</sub>-Wert in HT-29) mit der Enzymhemmung (IC<sub>50</sub>-Wert in TrxR) der Platinkomplexe**



Eine lineare Korrelation der *in situ*-Inhibition von TrxR mit der Zytotoxizität konnte nicht gefunden werden (siehe Abb. 17-4). Desweiteren war es schwierig Struktur-Wirkungs-Beziehung zu definieren. Die Thioredoxinreduktase scheint daher nicht das alleinige Target der Platin-Alkynyl-Komplexe zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Platin-Alkynyl-Komplexe effektive und selektive Thioredoxinreduktaseinhibitoren im unteren bis submikromolaren Bereich sind. Für Platinkomplexe wurde bisher nur von einer *in vitro*-Inhibition der TrxR im mikromolaren Bereich berichtet, was ein Hinweis auf einen andersartigen Wirkmechanismus der Platin-Alkynyl-Komplexe ist. Goldkomplexe sind die effektivsten Thioredoxinreduktaseinhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im nanomolaren Bereich und führen die Tumorzellen aufgrund erhöhter Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in den programmierten Zelltod [51, 53, 247, 248]. Für eine weitere biologische Charakterisierung sind daher Untersuchungen zum Einfluss der Platin-Alkynyl-Komplexe auf den Redoxstatus der Zelle besonders interessant.

## 18. Zusammenfassende Diskussion

Es wurden neue Platin(II)-Komplexe mit Phenylacetylid-Liganden synthetisiert und charakterisiert. Ferner erfolgte eine erste Charakterisierung der biologischen Eigenschaften dieser neuen Substanzfamilie im Hinblick auf die Aufklärung des bisher unbekannten Targets der neuartigen Platinkomplexe.

Die Platin(II)-Alkynyl-Komplexe wurden ausgehend vom Präkursor-Komplex  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  unter Umsetzung mit dem zuvor deprotonierten Phenacetylid-Liganden in der Kälte synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Komplexe  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})_2]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CC}(4\text{OMe})\text{Ph})]$  hergestellt und charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgte mittels NMR-Spektroskopie sowie Elementaranalyse und bestätigte die erfolgreiche Darstellung der Platinkomplexe. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Klein wurde der Pool an Platin(II)-Alkynyl-Komplexen erweitert und in zwei Serien unterteilt: die symmetrischen Platinkomplexe mit Dialkynyl-Koliganden sowie die entsprechenden unsymmetrischen Methyl/Alkynyl-Derivate. Letztere wurden ausgehend von  $[\text{PtCl}(\text{Me})(\text{cod})]$  unter identischen Bedingungen synthetisiert.

Mit Blick auf den potentiellen Einsatz der Platin(II)-Alkynyl-Komplexe als Antitumorwirkstoffe wurden die antiproliferativen Eigenschaften der neuen Substanzfamilie im Tumorzellmodell untersucht. Dafür wurden Brust- und Darmkrebszelllinien ausgewählt, da es sich dabei um die am meisten vorkommenden Krebsformen handelt. Alle untersuchten Komplexe zeigten eine sehr gute antiproliferative Potenz mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten, die teilweise im nanomolaren Bereich lagen. Sie sind damit alle aktiver als Cisplatin sowie die Präkursor-Komplexe  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  und  $[\text{PtCl}(\text{Me})(\text{cod})]$ . Nach genauerer Betrachtung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte im Zusammenhang mit der Molekülstruktur der Komplexe, ließen sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen formulieren. Besonders interessant war dabei die Tatsache, dass die Dialkynyl-Komplexe mit wenigen Ausnahmen aktiver waren als ihre unsymmetrischen Methyl-substituierten Derivate. Eine Erklärung dafür könnte die unterschiedliche räumliche Orientierung und Stabilität dieser Komplexe sein.

Darüberhinaus wurde die *in vivo*-Toxizität der Platinkomplexe auf den Gesamtorganismus und die Embryonalentwicklung im Zebrafischembryo als Modellorganismus

untersucht. Dieses erste präklinische Screening ergab, dass hohe Konzentrationen der Platinkomplexe mit Dialkynyl-Liganden auch über längere Inkubationszeiten gut toleriert wurden. Die entsprechenden Methyl-substituierten Derivate zeigten dagegen starke toxische Effekte, die sich in Missbildungen, fehlendem Herzschlag oder vollständigem Zerfall der Zebrafischembryos in einzelne Fragmente mikroskopisch darstellen ließen. Besonders interessant war die Tatsache, dass diese Effekte erst nach 24 bis 48 Stunden auftraten, was dem Zeitraum der Blutgefäßbildung des Zebrafischembryos entspricht. Eine antiangiogene Wirkung dieser Substanzfamilie ist, wie sie für die strukturell verwandten Gold-Alkynyl-Komplexe bereits nachgewiesen wurde, möglich. Aus den  $IC_{50}$ -Werten in Tumorzellen und den berechneten  $LC_{50}$ -Werten im Zebrafischembryo konnten Rückschlüsse auf die therapeutische Breite der Platin-Alkynyl-Komplexe gezogen werden. Diese ist für die untersuchten Dialkynyl-Komplexe mit Ausnahme des *p*-Methoxy-substituierten Platinkomplexes größer als für die unsymmetrischen Derivate.

Für eine mögliche Targetidentifizierung der neuen Substanzfamilie war es erforderlich die Zellgängigkeit der Platin-Alkynyl-Komplexe genauer zu untersuchen. Deshalb wurden Zellaufnahmeuntersuchungen in HT-29 Zellen mit ausgewählten Platinkomplexen durchgeführt. Alle untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe reichert sich stärker in den Tumorzellen an als die Referenzsubstanz Cisplatin. Die höhere zelluläre Aufnahme könnte damit die Ursache für die im Vergleich zum Cisplatin niedrigeren  $IC_{50}$ -Werte dieser Substanzfamilie sein. Ein Target im Inneren der Zelle ist als wahrscheinlich anzusehen. Eine direkte Korrelation der antiproliferativen Potenz mit der zellulären Konzentration der Platin-Alkynyl-Komplexe konnte dagegen nicht belegt werden. Für die Wirksamkeit scheinen weitere biochemische oder physikochemische Eigenschaften, wie z.B. die Affinität zum Target, relevant zu sein.

Als mögliche intrazelluläre Targets wurden die DNA und das Selenoenzym Thioredoxinreduktase genauer untersucht. Die DNA ist als Target für viele Antitumorstoffe, insbesondere für die zur Therapie zugelassenen Platinkomplexe (Cisplatin etc.), bekannt. In Bindungsexperimenten an isolierter Lachsspermien-DNA sowie durch UV-spektroskopische Untersuchung der Schmelztemperaturverschiebung von ctDNA wurden die Bindungseigenschaften der Platin-Alkynyl-Komplexe zur DNA genauer charakterisiert. Die experimentellen Daten belegten eine z.T. starke Affinität der untersuchten Platin-Alkynyl-Komplexe zur DNA, die je nach Geometrie und Elektrophilie der Liganden ein unterschiedliches Ausmaß hatte. Die DNA ist somit als ein mög-

liches Target der Platin-Alkynyl-Komplexe in Betracht zu ziehen. Zur genaueren Charakterisierung der Bindungsart sind jedoch zusätzliche Untersuchungen notwendig.

Als weiteres mögliches Target der Platin-Alkynyl-Komplexe wurde die Thioredoxinreduktase, die in Tumorzellen überexprimiert ist und eine wichtige Rolle im Redoxstoffwechsel der Zelle spielt, untersucht. Eine Hemmung der Thioredoxinreduktaseaktivität verursacht eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in der Tumorzelle, was letztendlich die Tumorzelle in den programmierten Zelltod führt. Die Platinkomplexe inhibierten die Thioredoxinreduktase selektiv im submikromolaren Konzentrationsbereich. Sie sind damit effektive Thioredoxinreduktaseinhibitoren, was für einen andersartigen Wirkmechanismus dieser Substanzfamilie im Vergleich zu bekannten Platinkomplexen spricht.

### **Schlußfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Platin(II)-Komplexe mit Phenacetylid-Liganden ein hohes Potential für den Einsatz als Antitumorwirkstoffe besitzen, da sie im Vergleich zur Referenzsubstanz Cisplatin eine höhere antiproliferative Potenz sowie eine verbesserte Zellaufnahme zeigen. Innerhalb der Substanzfamilie der Platin-Alkynyl-Komplexe konnten dabei Unterschiede je nach Substitutionsmuster des Phenacetylid-Liganden und der Molekülgeometrie festgestellt werden. Eine Optimierung der Molekülstruktur ist für die weitere Forschung angedacht. Im Hinblick auf die Targetidentifizierung konnte die DNA als mögliches Zielmolekül aufgrund der hohen Bindungsaffinitäten der neuen Platinkomplexe identifiziert werden. Besonders vielversprechend ist außerdem die für Platinkomplexe bisher nicht bekannte hohe inhibitorische Aktivität der Platin-Alkynyl-Komplexe auf das Selenoenzym Thioredoxinreduktase. Diese Eigenschaft lässt einen andersartigen Wirkmechanismus vermuten, der möglicherweise die Nachteile der bekannten Platinkomplexe überwindet. Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus und Charakterisierung der Bioverteilung der Platin-Alkynyl-Komplexe wären daher besonders interessant.

## **V Material und Methoden**

## 19. Material

Alle Reagenzien, Chemikalien und Lösemittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich, Acros Organic, Fluka oder anderen Firmen bezogen.

### 19.1 Geräte

- Analysenwaage: CPA225D (Sartorius)
- Atomabsorptionsspektrometer: ContrAA 700 (Analytik Jena)
- Autoklav: LTA 2x3x4 Autoklav (Zyrbus Technologies)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator: Binder Incubator (Binder), HerCell240i CO<sub>2</sub> Inkubator (ThermoScientific)
- CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Jouan)
- Homogenisator: Dounce tissue grinder (Wheaton)
- Elementaranalyator: Flash ES112 (Thermo Quest Italia)
- Inkubator: Vortemp 56 (Labnet)
- Kernresonanzsspektroskopie: DRX-400 AS (Bruker)
- Mikroplattenlesegerät: Victor x4 (Perkin Elmer)
- Mikroskop: S8APO, Modell MDG33/10450123 (Leica)
- Mikrozentrifuge: CT15RE HMAc (VWR)
- pH-Meter: SevenEasy pH-Meter (Mettler-Toledo)
- Schüttler: Titramax 1000 (Heidolph)
- Sicherheitsbunsenbrenner: Fireboy plus (Integra Bioscience)
- Ultraschallbad (VWR)
- UV-Spektrometer: Specord 200 (Analytik Jena)
- Videomikroskop: EVOSxl (AMG) oder JuliBr Live Cell Analyzer (Peqlab Biotechnology GmbH)

- Vortex: Vortex genie 2 (ScientificIndustries)
- Werkbank: HeraSafeKS (ThermoScientific)
- Zählkammer: C-Chip Neubauer Improve counting chamber (Biochrom AG)
- Zentrifuge: CompactStarCS4 (VWR)

## 19.2 Lösungen und Reagenzien

- Aufbewahrungspuffer: 1,25 M Saccharose, 5 mM ATP, 0,4 mM ADP, 25 mM Natriumsuccinat, 10 mM  $K_2HPO_4$  und 5 mM DTT in 50 mM HEPES (pH 7,5); vor der Verwendung wird die Lösung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt
- Bradford-Reagenz: 250 mg Serva Blue G, 250 mL Ethanol (95 %), 500 mL  $H_3PO_4$  (86 %) und 250 mL  $H_2O$  werden gemischt
- BSA-Lösung: 2 mg BSA (Rinderserumalbumin) in 1 mL demineralisiertem Wasser, frisch hergestellt
- Danieau-Medium: 58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM  $MgSO_4$ , 0,6 mM  $Ca(NO_3)_2$  and 5 mM HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (pH 7,2)
- DNA-Lösung: Lachsspermien-DNA (Desoxyribonukleinsäure) gelöst in Phosphatpuffer (pH 7,4)
- DTNB-Lösung: 20 mM DTNB (2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure) in Ethanol (absolut), frisch hergestellt
- EDTA-Lösung: 100 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) in demineralisiertem Wasser (pH 7,5)
- Eiwasser: 0,06 g Meersalz werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst
- Extraktionspuffer: 50 mM HEPES (pH 7,5) enthält 1 M Mannitol, 350 mM Saccharose und 5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure) ; vor der Verwendung wird die Lösung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und es wird ein Proteaseinhibitorcocktail (1:100 (v/v)) hinzugegeben

- FCS: fetales Kalbserum (Biochrom AG)
- Kaliumphosphatpuffer: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in demineralisiertem Wasser (pH 7,0)
- Kristallviolett-Lösung: 0,02 % Kristallviolett gelöst in demineralisiertem Wasser
- NADPH-Lösung: 20 mM NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) in demineralisiertem Wasser, frisch hergestellt
- Phosphatpuffer: 8,0 g, NaCl, 1,0 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g KCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 L demineralisiertem Wasser (pH 7,4)
- Pronase: 5 mg Pronase (Roche Applied Science) werden in 1 mL Danieau-Medium gelöst
- Proteaseinhibitorcocktail: 104 mM AEBSF, 80  $\mu\text{M}$  Aprotinin, 4 mM Bestatin, 1,4 mM E-64, 2 mM Leupeptin, 1,5 mM Pepstatin A in DMSO (Dimethylsulfoxid)
- Reaktionsmischung: 500  $\mu\text{L}$  Kaliumphosphatpuffer, 80  $\mu\text{L}$  EDTA-Lösung, 20  $\mu\text{L}$  BSA-Lösung, 100  $\mu\text{L}$  NADPH-Lösung und 300  $\mu\text{L}$  demineralisiertes Wasser werden frisch gemischt und bei 0-4 °C aufbewahrt
- Isolationslösung 1: 0,01 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,4)
- Isolationslösung 2: Isolationslösung 1 + 0,3 % Nonidet-P40 + 0,3 % Natrium-Desoxycholsäure
- Saccharose-Lösung 1: 0,25 M Saccharose + 3 mM  $\text{CaCl}_2$
- Saccharose-Lösung 2: 0,88 M Saccharose
- Serumfreies Zellkulturmedium: DMEM High Glucose (PAA laboratories GmbH) mit Zusatz von 10 % FCS
- Trypsin-Lösung: 0,05 % Trypsin in Phosphatpuffer (pH 7,4)
- Verdünnte Glutardialdehydlösung: 12,5 mL Phosphatpuffer pH 7,4 werden mit 0,5 mL Glutardialdehyd (25 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt



- Zellkulturmedium: DMEM High Glucose (PAA laboratories GmbH) versetzt mit 50 mg/L Gentamycinsulfat (USBiological) und 10 % (v/v) FCS

## 20. Methoden

### 20.1 Synthesen

#### Allgemeine Arbeitstechniken

Die Synthese der Platinkomplexe erfolgte mittels Schlenktechnik unter Stickstoffatmosphäre mit Stickstoff der Firma Westfalen. Es wurden ungetrocknete Lösungsmittel verwendet. Die kommerziell erhältlichen Chemikalien und Reagenzien sind in Tab. 20-1 aufgeführt.

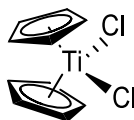
**Tab. 20-1: Kommerziell erworbene Reagenzien**

Reagenz	Hersteller
4-Methoxyphenylacetylen	Maybridge
Acetylchlorid	Sigma Aldrich
Dichloro(cod)platin(II)	Acros Organics
Diisopropylethylamin	Acros Organics
Dimethyl(cod)platin(II)	Aldrich
Pt Standard Stock Solutions, ICP quality	Fluka Analytical
Ti Single Element Solution for AAS	Fisher Scientific
Titanocendichlorid	Arcos Organics
Triton®-X100	Sigma

### 20.1.1 Synthese der Titankomplexe

#### Titanocendichlorid

$\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ , Bis(cyclopentadienyl)titan(IV) dichlorid



Der Metallkomplex Titanocendichlorid ( $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ ) wurde von Arcos Organics bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

#### Titan-Salan-Komplexe

$\text{Ti}(\text{L}^{1-7})(\text{O}i\text{Pr})_2$ , Diamino-bisphenolato-titan(IV)

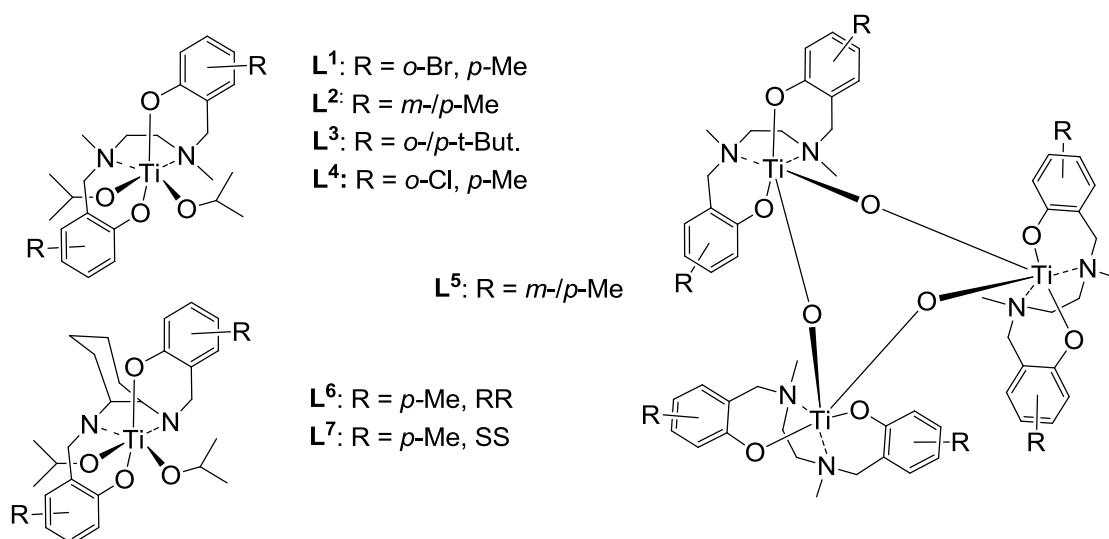
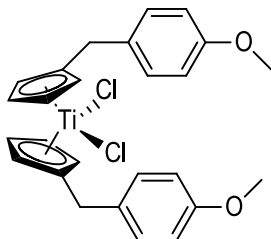


Abb. 20-1: Titan(IV)-Salan-Komplexe  $\text{Ti}(\text{L}^{1-7})(\text{O}i\text{Pr})_2$

Die Synthesen der Titan-Salan-Komplexe (siehe Abb. 20-1) wurden am Institut für Anorganische Chemie der Hebrew University of Jerusalem in Israel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Edit Tshuva durchgeführt [170].

## Titanocen Y

$\text{TiCl}_2(\text{Bis}-(4\text{OMe})(\text{Benz})\text{Cp})_2$ , Bis-[(p-methoxybenzyl)cyclopentadienyl]titan(IV) dichlorid



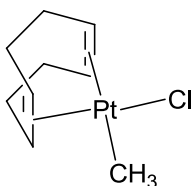
Die Synthese des Titankomplexes Titanocen Y wurde an der UCD School of Chemistry and Chemical Biology des University College Dublin in Irland im Arbeitskreis von Dr. Matthias Tacke durchgeführt [249].

### 20.1.2 Synthese der Platinkomplexe

Der Ligand 4-Methoxyphenylacetylen wurden von Sigma Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Alle von Klein *et al.* verwendeten Liganden wurden ebenfalls käuflich erworben oder im Fall von 2-Nitrophenylacetylen, 3-Nitroacetylen und 4-Nitroacetylen selbst synthetisiert [44,226].

Wie in der Literatur beschrieben wurde, der Metallkomplex  $[\text{PtCl}(\text{cod})(\text{Me})]$  synthetisiert [227]. Die Metallkomplexe  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  und  $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})_2]$  wurden von Sigma Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

#### $[\text{PtCl}(\text{cod})(\text{Me})]$ , Chlorido(methyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)



**Ausbeute:** 174,52 mg (0,493 mmol; 67 %).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0,92 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,30 (m, 8H,  $\text{CH}_2$  cod); 4,50 (m, 2H,  $=\text{CH}$  cod); 5,53 (m, 2H,  $=\text{CH}$  cod). Elementaranalyse für  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ClPt}$  (% berechnet/gefunden): C (30,56/30,58) H (4,27/21).

### 20.1.2.1. Serie I: Typ $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{CCR})_2]$

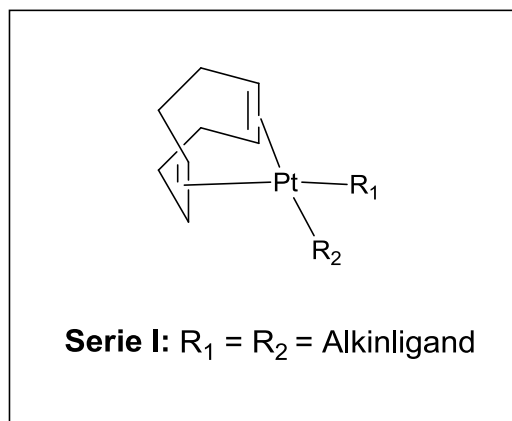
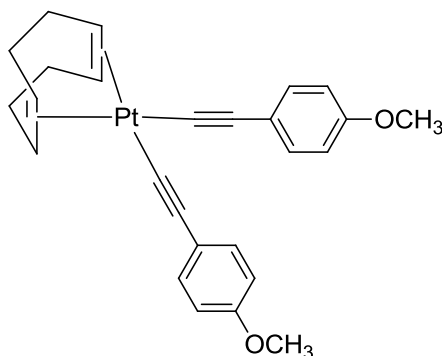


Abb. 20-2: Chemische Struktur der Serie I

#### Allgemeine Synthesevorschrift der Serie I (siehe Abb. 20-2)

Eine Lösung aus Natriumethanolat und 0,587 mmol (2,2 Äq.) des Alkin wird in 5 mL Ethanol (absolut) hergestellt und für 20-30 Minuten gerührt. 100 mg (0,267 mmol)  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  werden in 10 ml Ethanol (absolut) im Eisbad suspendiert. Die Alkin-Lösung wird anschließend tropfenweise hinzugegeben, wobei sich die Reaktionslösung von farblos auf hellgelb bis bräunlich färbt. Nach 15 Minuten wird das Eisbad entfernt und weitere 105 Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wird unter vermindertem Druck abfiltriert und mit Ethanol und Diethylether gewaschen. Abschließend wird mit Dichlormethan/*n*-Hexan umkristallisiert.

#### $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{C}\equiv\text{C}(\text{4OMe})\text{Ph})_2]$ , Bis((4-methoxyphenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)



**Ausbeute:** 48,8 mg (0,086 mmol; 38 %).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2,56 (m, 8H,  $\text{CH}_2$  cod); 3,78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,67 (m, 4H =CH cod); 6,80 (dd, 4H, *m*-Ph); 7,35 (dd,

4H, o-Ph). Elementaranalyse für  $C_{26}H_{26}O_2Pt$  (% berechnet/gefunden): C (55,22/54,53) H (4,63/4,33).

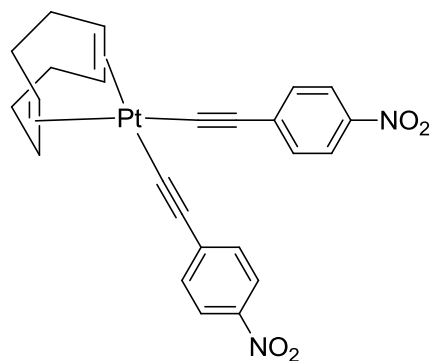
Die in der Tab. 20-2 gelisteten Platinkomplexe des Typs  $[Pt(cod)(CCR)_2]$  wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Köln im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klein synthetisiert [44, 226].

**Tab. 20-2: Liste der im Arbeitskreis Klein synthetisierten Platinkomplexe des Typs  $[Pt(cod)(CCR)_2]$**

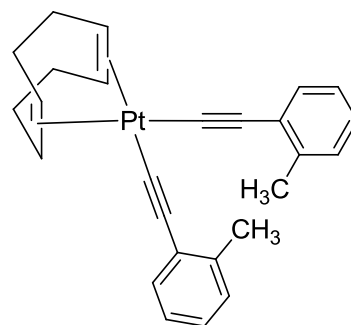
Abkürzung	Name	Struktur
$[Pt(cod)(CCPh)_2]$	Bis(phenylethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)	
$[Pt(cod)(CC(2NO_2)Ph)_2]$	Bis((2-nitrophenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)	
$[Pt(cod)(CC(3NO_2)Ph)_2]$	Bis((3-nitrophenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II),	



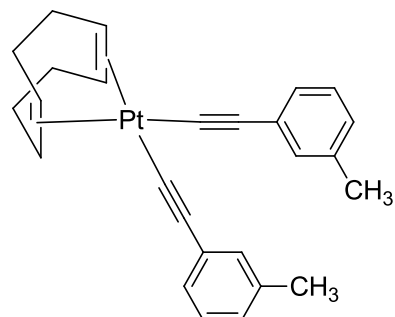
**Bis((4-nitrophenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)**



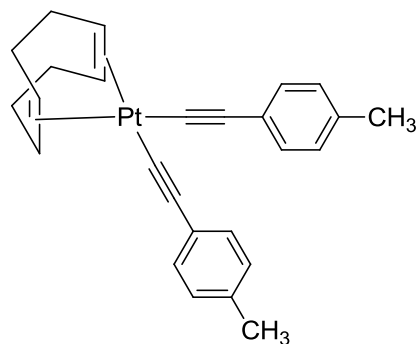
**Bis((2-methylphenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)**



**Bis((3-methylphenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)**

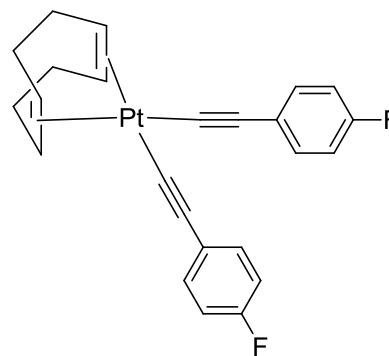


**Bis((4-methylphenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)**

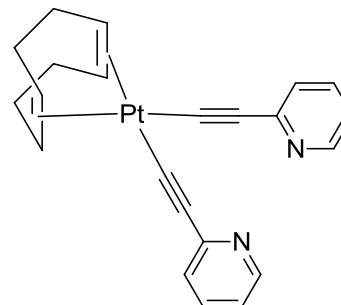




Bis((4-fluorophenyl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)



Bis((Pyridin-2-yl)ethynyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)



#### 20.1.2.2. Serie II: Typ $[\text{Pt}(\text{cod})(\text{Me})(\text{CCR})]$

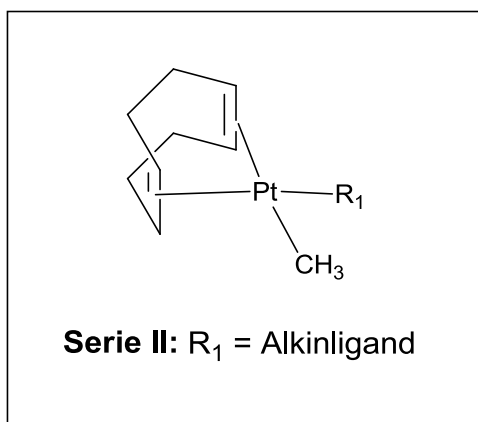


Abb. 20-3: Chemische Struktur der Serie II

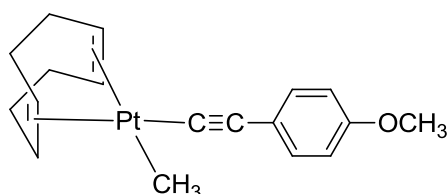
#### Allgemeine Synthesevorschrift der Serie II (siehe Abb. 20-3)

Eine Lösung aus Natriumethanolat und 0,587 mmol (2,2 Äq.) des Alkins wurde in 5 mL Ethanol (absolut) hergestellt und für 20-30 Minuten gerührt. 100 mg (0,267 mmol)  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  wurden in 10 mL Ethanol (absolut) im Eisbad suspendiert. Die Alkin-Lösung wurde anschließend tropfenweise hinzugegeben, wobei sich die Reaktionslösung von farblos auf hellgelb bis gelb färbt. Nach 15 Minuten wurde das Eisbad



entfernt und weitere 105 Minuten gerührt. Der Ansatz wurde für 3 Tage bei -21 °C gelagert. Abschließend wurde das Lösemittel eingeeengt und mit Dichlormethan/*n*-Hexan umkristallisiert, wodurch ein gelb-brauner Feststoff erhalten wurde.

**((4-Methoxyphenylethynyl)(methyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II),  
[Pt(cod)Me](CC(4OMe)Ph)]**

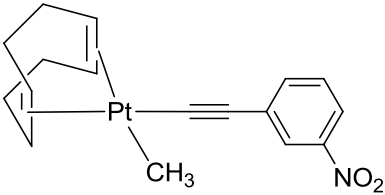
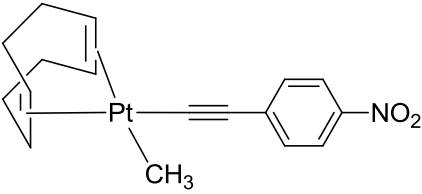
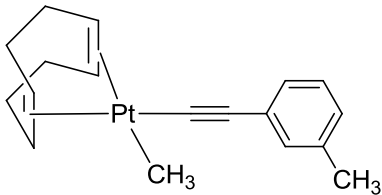
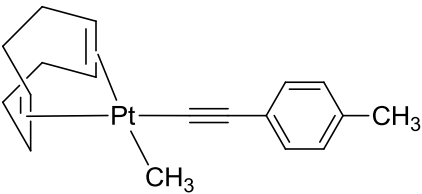
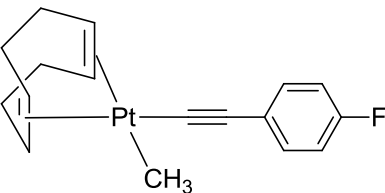
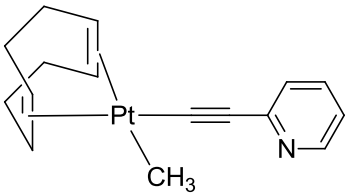


**Ausbeute:** 38,3 mg (0,085 mmol; 59 %). **<sup>1</sup>H-NMR** (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ [ppm] = 0,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,44 (m, 8H, CH<sub>2</sub> cod); 3,77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,89 (m, 2H, =CH cod); 5,46 (m, 2H, =CH cod); 6,78 (m, 2H, *meta*-Ph); 7,23 (m, 2H, *ortho*-Ph). Elementaranalyse für C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>OPt (% berechnet/gefunden): C (48,10/48,96) H (4,93/4,73).

Die in Tab. 20-3 gelisteten Platinkomplexe des Typs [Pt(cod)(Me)(CCR)] wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Köln im Arbeitskreis von Prof. Dr. Klein synthetisiert. [44, 226]

**Tab. 20-3: Liste der im Arbeitskreis Klein synthetisierten Platinkomplexe des Typs  
[Pt(cod)(Me)(CCR)]**

Abkürzung	Name	Struktur
[Pt(cod)(Me)(CCPh)]	(Phenylethynyl)(methyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)	
[Pt(cod)(Me)(CC(2NO <sub>2</sub> )Ph)]	((2-Nitrophenylethynyl)(methyl)( $\eta^4$ -1,5-cyclooctadien)platin(II)	

<b>[Pt(cod)(Me)(CC(3NO<sub>2</sub>)Ph)]</b>	<b>((3-Nitrophenylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 3-nitrophenyl ring.</p>
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4NO<sub>2</sub>)Ph)]</b>	<b>((4-Nitrophenylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 4-nitrophenyl ring.</p>
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(3Me)Ph)]</b>	<b>((3-Methylphenylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 3-methylphenyl ring.</p>
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4Me)Ph)]</b>	<b>((4-Methylphenylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 4-methylphenyl ring.</p>
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(4F)Ph)]</b>	<b>((4-Fluorophenylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 4-fluorophenyl ring.</p>
<b>[Pt(cod)(Me)(CC(Py)Ph)]</b>	<b>((Pyridin-2-ylethynyl)(methyl)(<math>\eta^4</math>-1,5-cyclooctadien)platin(II))</b>	 <p>The structure shows a platinum(II) center coordinated to a 1,5-cyclooctadiene (cod) ligand in a <math>\eta^4</math> fashion, a methyl group, and an ethynyl group. The ethynyl group is substituted with a 2-pyridyl ring.</p>

## 20.2 HR-CS AAS

Zur Metallquantifizierung wurde ein hochauflösendes Atomabsorptionsspektrometer mit Kontinuumstrahler contrAA© 700 (Analytik Jena) verwendet. Titan wurde bei einer Wellenlänge von 364,2675 nm und Platin bei einer Wellenlänge von 265,945 nm gemessen. Das in ein beschichtetes Standard-Graphitrohr ("AAS IC-Standardrohr, beschichtet". AnalytikJena AG) injizierte Probenvolumen pro Messung betrug 25 µL. Es wurde der Mittelwert der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3- oder 4-fach Injektionen zur Auswertung herangezogen. Die Nachweisgrenze für Titan lag bei 48,8 µg/L. Für Platin wurde keine Nachweisgrenze bestimmt.

### 20.2.1 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung umfasste die Optimierung des Temperatur-/Zeitprogramms sowie der Probenvorbereitung. Der Optimierungsprozess beinhaltete die Anpassung der Pyrolyse- und Atomisierungstemperatur sowie der Trocknungs- und Ausheizschritte, wobei auf eine bereits publizierte Methode zurückgegriffen wurde [159, 183]. Außerdem wurde der Einfluß verschiedener Modifikatoren (Ascorbinsäure 18 % (v/v), Salpetersäure 13 % (v/v) und Salzsäure 18 % (v/v)) sowie verschiedener Proteinkonzentrationen (0,55 mg/mL und 1,10 mg/mL) auf das resultierende AAS-Signal untersucht (siehe 8.1). Für die Methodenentwicklung (siehe Kapitel 8) wurde eine Titan-Standardlösung (Single Element Solution for AAS, Fisher Scientific), die 1000 ppm Titan enthält, verwendet. Ausgehend von dieser Lösung wurden weitere wässrige Lösungen mit unterschiedlichen Titankonzentrationen im Bereich 0-1500 µg/L durch Verdünnen mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Die für die Untersuchung des Matrixeffekts und des Modifikatoreinflusses verwendeten Matrix-Standardlösungen wurden wie folgt vorbereitet: ein isoliertes Zellpellet (siehe 20.9.1) aus HT-29 Zellen wurde in 1,0 mL demineralisiertem Wasser suspendiert und für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde ein Aliquot von 10 µL für die Proteinbestimmung nach Bradford entnommen. Die Zellsuspension wurde auf den gewünschten Proteingehalt durch Verdünnen mit demineralisiertem Wasser eingestellt und für die Herstellung der Matrix-Standardlösungen verwendet. Alle Proben wurden vor der Messung frisch hergestellt. Zur Untersuchung des Modifikatoreinflusses erfolgte ein 10 %-iger Zusatz zu diesen Proben ebenfalls kurz vor der Messung.

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde die Blindprobe 11-fach gemessen und der Mittelwert der gemessenen Absorptionen ( $x_B$ ) sowie die Standardabweichung ( $\sigma_B$ ) berechnet. Für die Berechnung der Absorption entsprechenden Titankonzentration wurde eine frisch hergestellte und direkt im Anschluss vermessene Standardkurve verwendet. Die Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) lässt sich wie folgt berechnen:

$$LOD = x_B + 3 \sigma_B$$

**Formel 20-1: Nachweisgrenze**

Die Bestimmungsgrenze (LOQ = limit of quantification) liegt um den Faktor 3 über der Nachweisgrenze und ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$LOQ = x_B + 9 \sigma_B$$

**Formel 20-2: Bestimmungsgrenze**

Zusätzlich wurde die charakteristische Konzentration bestimmt, die der Titankonzentration bei einem Absorptionswert von 0,0044 entspricht. Die Linearität der Kalibrierkurven wurde durch Bestimmung des Korrelationskoeffizienten ( $r^2 > 0.95$ ) sichergestellt. Die Präzision wurde als Standardabweichung von 12 Injektionen einer Probe mit 2 verschiedenen Titankonzentrationen (200  $\mu\text{g/L}$  und 1000  $\mu\text{g/L}$ ), die eine Proteinkonzentration von 1 mg/mL aufwies, bestimmt.

### **20.2.2 Titanquantifizierung**

Für die Titanquantifizierung wurde ein zuvor optimiertes Temperatur-/Zeitprogramm verwendet, welches in Tab. 20-4 dargestellt ist (siehe 8.1 und 20.2.1). Die Kalibrierlösungen wurden aus einer Stammlösung der Testsubstanz durch Verdünnen mit einer Proteinlösung, die denselben Proteingehalt wie die Probenlösungen aufwies, frisch hergestellt. Die Proben- und Standardlösungen wurden vor der Messung mit 10 % (v/v) Triton®-X100 (1 %) und 10 % (v/v)  $\text{HNO}_3$  (13 %) versetzt.

**Tab. 20-4: Temperatur-/Zeitprogramm für Titanmessungen**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Heizrate (°C/s)</b>	<b>Halten (s)</b>
Trocknen	90	6	15
Trocknen	130	10	30
Trocknen	500	50	30
Pyrolyse	1400	300	20
Nullabgleich	1400	0	5
Atomisierung	2600	1500	10
Ausheizen	2650	500	5
Abkühlen	100	500	5
Ausheizen	2650	500	5

### 20.2.3 Platinquantifizierung

Zur Quantifizierung der Platinkomplexe wurde auf das in der AAS-Software ASpect CS hinterlegte Temperatur-/Zeitprogramm mit optimierten Trocknungsschritten für die sichere Entfernung von biologischem Material zurückgegriffen (siehe Tab. 20-5). Für die Untersuchung des Matrix-Effekts wurden wässrige Platin-Standardlösungen sowie Matrix-haltige ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) Platin-Standardlösungen ( $c = 250 \text{ µg/L}$ ) hergestellt. Die Matrix-haltigen Lösungen wurden wie folgt vorbereitet: ein isoliertes Zellpellet (siehe 20.9.1) aus HT-29 Zellen wurde in 1,0 mL demineralisiertem Wasser suspendiert und für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde ein Aliquot von 10 µL für die Proteinbestimmung nach Bradford entnommen. Die Zellsuspension wurde auf den gewünschten Proteingehalt durch Verdünnen mit demineralisiertem Wasser eingestellt und für die Herstellung der Matrix-Standardlösungen verwendet. Alle Proben wurden vor der Messung frisch hergestellt.

Zur Quantifizierung der Zellaufnahme erfolgte die Kalibrierung mit den untersuchten Platinkomplexen in Proteinmatrix mit angepasster Proteinkonzentration. Alle Proben

und Standards wurden mit 10 % (v/v) Triton® X100 (1 %) und 5 % (v/v) HNO<sub>3</sub> (13 %) versetzt und frisch hergestellt.

**Tab. 20-5: Temperatur-/Zeitprogramm für Platinmessungen**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Heizrate (°C/s)</b>	<b>Halten (s)</b>
Trocknen	90	6	15
Trocknen	130	10	30
Trocknen	500	50	30
Pyrolyse	1300	300	10
Nullabgleich	1300	0	5
Atomisierung	2300	1500	8
Ausheizen	2450	500	4

### **20.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen (*In vitro*-Toxizität)**

Für die Untersuchung der antiproliferativen Aktivität der Metallkomplexe nach einer bereits etablierten Methode [250] wurden MCF-7 Brustkrebszelllinie, HT-29 Darmkrebszelllinie und L-929 Mausfibroblasten verwendet. Bei allen Zelllinien handelt es sich um adhärenzte Zelllinien, die bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (siehe 20.9) in DMEM High Glucose (PAA laboratories GmbH) Zellkulturmedium, welches vor der Verwendung frisch mit 50 mg/L Gentamycin (USBiological) und 10 % (v/v) fetales Kalbserum (Biochrom AG) versetzt wurde, kultiviert. Die Ergebnisse wurden meistens als Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten angegeben. Eine Übersicht über den Ablauf des Experiments ist in Abb. 20-4 zu sehen und im Folgenden näher beschrieben.

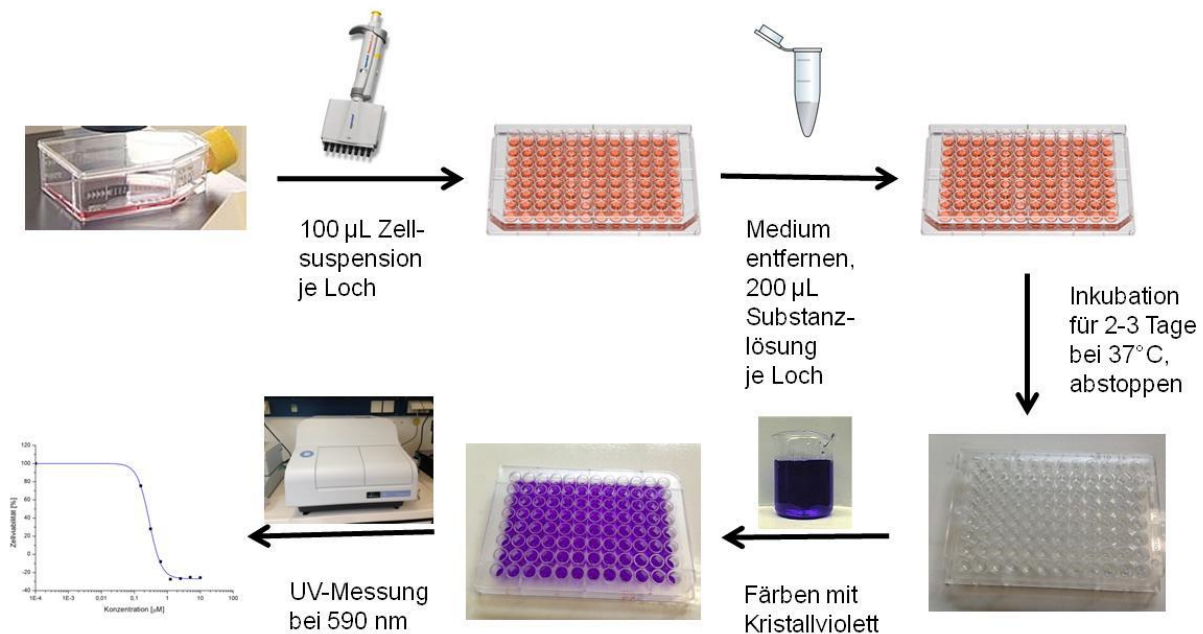


Abb. 20-4: Fließdiagramm zur Zytotoxizitätsuntersuchung

### Aussaat der Zellen

Von der zu testenden Zelllinie wurde eine Zellsuspension (ca. 10000 Zellen/mL für MCF-7, ca. 3000 Zellen/mL für HT-29, ca. 7000 Zellen/mL bei L-929) hergestellt und von dieser 100  $\mu$ L in jedes Loch einer 96-Lochplatte pipettiert. Die Platten wurden für 2 Tage (HT-29, L-929) bzw. 3 Tage (MCF-7) im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, wobei es zum Anwachsen der Zellen auf dem Plattenboden kam.

### Substanzstammlösungen und Substanzzugabe

Die Substanzstammlösungen wurden vor der Versuchsdurchführung frisch hergestellt. Dazu wurde der Metallkomplex abgewogen und in DMF gelöst, so dass eine 100 millimolare Lösung entstand. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden weitere Substanzstammlösungen im Konzentrationsbereich 0-100 mM nach einem Verdünnungsschema hergestellt (siehe Tab. 20-6). Jeweils 5  $\mu$ L der Substanzstammlösung wurden zu 5 mL Zellkulturmedium gegeben und gut durchmischt (Verdünnung 1:1000; mM  $\rightarrow$   $\mu$ M). Je 200  $\mu$ L dieser Lösung wurden in 6 Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert, in denen zuvor das Zellkulturmedium abgesaugt wurde. Analog zu den zu testenden Substanzkonzentrationen wurde ein Blindwert (DMF) hergestellt und in 6 Löcher der 96-Lochplatte pipettiert.

Tab. 20-6: Verdünnungsschema für die Testsubstanzen

<b>c (mM)</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0,2</b>
<b>µL</b>	20	10	20	10	25	10
<b>(mM Stammlösung)</b>	(100)	(100)	(20)	(20)	(4)	(1)
<b>+ µL DMF</b>	20	40	20	40	75	40

Das Schema zur Belegung der 96-Lochplatte ist in Tab. 20-7 wiedergegeben. Zusätzlich wurde eine  $t_0$ -Platte am Tag der Substanzzugabe gestoppt, mit dessen Hilfe die Zellmasse vor Substanzzugabe bestimmt werden konnte. Dazu wurde das Zellkulturmedium einer 96-Lochplatte komplett abgesaugt und durch 180 µL Phosphatpuffer (pH 7,4) nach vorheriger Fixierung der Zellen am Plattenboden mit verdünnter Glutardialdehydlösung ersetzt. Diese Platte wurde bis zur Färbung mit Kristallviolett im Kühlschrank aufbewahrt.

Tab. 20-7: Plattenbelegung

<b>Reihe</b>	<b>Löcher 1-6</b>	<b>Löcher 7-12</b>
<b>A</b>	Blindwert 1 (DMF)	Substanz 1 (0,2 µM)
<b>B</b>	Substanz 1 (1 µM)	Substanz 1 (4 µM)
<b>C</b>	Substanz 1 (10 µM)	Substanz 1 (20 µM)
<b>D</b>	Substanz 1 (50 µM)	Substanz 1 (100 µM)
<b>E</b>	Blindwert 2 (DMF)	Substanz 2 (0,2 µM)
<b>F</b>	Substanz 2 (1 µM)	Substanz 2 (4 µM)
<b>G</b>	Substanz 2 (10 µM)	Substanz 2 (20 µM)
<b>H</b>	Substanz 2 (50 µM)	Substanz 2 (100 µM)



## Abstoppen und Kristallviolettfröbung

Nach 3 Tagen (HT-29) bzw. 4 Tagen (MCF-7, L-929) Inkubationszeit der 96-Lochplatten im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde das Zellkulturmedium, welches die zu testenden Metallkomplexe enthält, abgesaugt. Anschließend wurden 100 µL verdünnte Glutaraldehydlösung in jedes Loch zur Fixierung der Zellen pipettiert und nach 20-30 Minuten abgeschüttelt. Nach Zugabe von 180 µL Phosphatpuffer (pH 7,4) und dessen Absaugen nach wenigen Minuten, wurden 100 µL einer 0,02 %-igen Kristallviolettlösung hinzugegeben. Kristallviolett ist ein Farbstoff, der die Zellen violett anfärbt. Nach 30 Minuten wurde die Kristallviolettlösung wieder abgeschüttelt und sofort 2 mal gründlich mit Wasser gewaschen. Die 96-Lochplatten wurden mit Wasser gefüllt und für 15 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde das Wasser durch gründliches Abklopfen auf Papiertücher vollständig entfernt. Nach Zugabe von 180 µL Ethanol (70 %) in jedes Loch wurden die Platten unter leichtem Schütteln für 3-4 Stunden stehen gelassen. Bei diesem Schritt löste sich der Farbstoff im Ethanol und die Absorption der Lösung wurde abschließend bei 590 nm im Mikroplattenlesegerät gemessen.

## Auswertung

Der Mittelwert (M) aus jeweils 6 Löchern, in denen sich dieselbe Substanzkonzentration befand, und der Mittelwert (B) aus jeweils 6 Löchern des Blindwertes wurden gebildet. Beide Absorptionsmittelwerte wurden um den Mittelwert aus allen Löchern der t<sub>0</sub>-Platte (t<sub>0</sub>) korrigiert und anschließend durcheinander geteilt sowie mit 100 % multipliziert:

$$\frac{T}{C_{\text{kor}}}} = 100 \times \frac{(M - t_0)}{(B - t_0)}$$

**Formel 20-3: Berechnung von T/C<sub>kor</sub>**

Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde berechnet als die Substanzkonzentration, bei der sich die Zellmasse um 50 % reduziert hat, was als eine 50 %-ige Inhibition des Zellwachstums durch die Substanz zu verstehen ist. Er wurde berechnet als T/C<sub>kor</sub> = 50 %. Dazu wurden die berechneten T/C<sub>kor</sub>-Werte gegen den Logarithmus der Substanzkonzentrationen aufgetragen und der sigmoidale Kurvenverlauf mit Hilfe der Boltzmann- oder

Hill-Funktion im Programm Origin berechnet. Der  $IC_{50}$ -Wert konnte dann bei  $T/C_{\text{korr}} = 50 \%$  abgelesen werden (siehe 9.1).

## 20.4 *In vivo*-Toxizität im Zebrafischembryo

Die Toxizität der Metallkomplexe in Zebrafischembryos wurde nach einer etablierten Methode untersucht [139]. Ein Schema zum Ablauf des Experiments ist in Abb. 20-5 zu sehen.

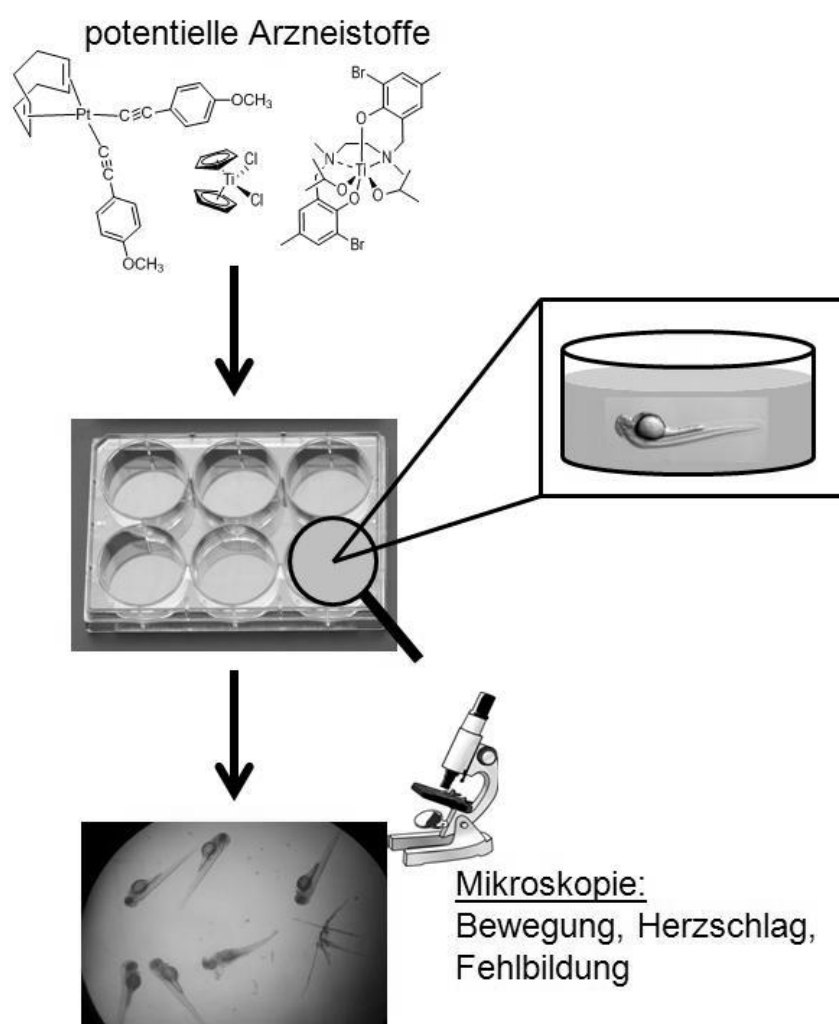


Abb. 20-5: Schema zur Bestimmung der *in vivo*-Toxizität

### Verpaaren der Zebrafische

Die Zebrafische wurden am Nachmittag des Tag 1 verpaart [139] Dazu wurden jeweils ein männlicher Fisch und ein weiblicher Fisch in ein separates Becken, zu-

nächst durch eine Trennwand separiert, gesetzt. Am nächsten Morgen (Tag 2) wurde der Trennsteg entfernt und es kam nach 30-60 Minuten zu einer Verpaarung der Fische, wobei die Eier vom Weibchen abgelegt wurden. Durch die spezielle Konstruktion des Beckens fielen die Eier durch ein Gitter, was dem Schutz der Eier vor dem Verzehr durch die Elterntiere diente. Die Eier wurden anschließend isoliert und die Fische zurück in das Becken gesetzt. Nach dem Waschen mit Eiwasser (siehe 19.2) wurden die Eier in eine Petrischale überführt und bei 27 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 7 Stunden Inkubationszeit wurde das Eiwasser durch Danieau-Medium (siehe 19.2) mit 10 % (v/v) Polythiouracil (PTU) ersetzt, was die Pigmentierung der Embryos verhindert. Nach 24 Stunden (Tag 3) wurde das Medium erneut gewechselt und die Eihüllen der Embryos wurden enzymatisch entfernt. Dazu wurden 2-3 mL einer Pronase-Lösung in das Medium gegeben und unter Schütteln für 20-30 Minuten inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Embryos mit Danieau-Medium lagen die Embryos dechorioniert vor und wurden zu je 50 Embryos pro Loch in eine 6-Lochplatte eingezählt. Anschließend wurde das Medium vollständig entfernt und durch 4 mL frisches Danieau-Medium mit 10 % (v/v) PTU ersetzt.

### Inkubation der Zebrafischembyros

Es wurde von der zu testenden Substanz eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM in DMF frisch hergestellt. Weitere Verdünnungen wurden nach dem Schema in Tab. 20-8 durch Verdünnen mit DMF durchgeführt.

**Tab. 20-8: Verdünnungsschema zur Herstellung der Stammlösungen**

<b>c (mM)</b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>µL</b>	20	10	20	10	25
<b>(mM Stammlösung)</b>	(100)	(100)	(20)	(20)	(4)
<b>+ µL DMF</b>	20	40	20	40	75

Zu den dechorionierten Embryos wurden je Loch 4 µL einer Substanzstammlösung bzw. Kontrolllösung (DMF) pipettiert. Anschließend wurde die 6-Lochplatte bis zur Auswertung in den Brutschrank (27 °C) gestellt.

## **Mikroskopie und Auswertung**

Nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubationszeit wurden die Embryos auf toxische Effekte mikroskopisch (Leica S8APO) untersucht. Dazu wurden diese hinsichtlich Herzschlagrate, Fehlbildungen und generalisierter Toxizität beurteilt. Die toten oder fehlgebildeten Embryos wurden dafür mit einer Pasteurpipette entfernt und die noch lebenden Embryos gezählt. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt und der prozentuale Wert der lebenden Embryos berechnet. Durch Auftragung der lebenden Embryos in Prozent gegen die Testkonzentration in  $\mu\text{M}$  und anschließendem logarithmieren der x-Achse kann mit Hilfe der Software Origin ein sigmoidaler Kurvenverlauf (Boltzmann- oder Hill-Funktion) erstellt werden. Der  $\text{LC}_{50}$ -Wert konnte dann bei lebende Embryos = 50 % berechnet werden und entspricht der Substanzkonzentration, bei der 50 % aller Embryos sterben.

## **20.5 Videomikroskopie**

Für die Aufnahmen mit dem digitalen Videomikroskop wurden HT-29 Zellen in Petrischalen ( $\varnothing$  60 x 15 mm) in Phenolrot-freiem Zellkulturmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von circa 40 % im  $\text{CO}_2$ -Inkubator gelagert. Nach der Inkubation wurde das Medium gegen 4,0 mL Phenolrot-freies Zellkulturmedium, das 10  $\mu\text{M}$  (0,1 % (v/v) DMF) der zu testenden Titankomplexe enthält, ausgetauscht. Als Kontrolle wurde DMF in derselben Konzentration verwendet. Die Petrischalen wurden anschließend für 14 Stunden bei Raumtemperatur unter das Mikroskop (EVOSxl, AMG) gestellt und Fotos wurden alle 5 Minuten aufgenommen.

## **20.6 DNA-Bindung**

Das DNA-Bindevermögen der Metallkomplexe wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht: der Ethanolpräzipitationsmethode und der DNA-Schmelztemperaturmethode.

### **20.6.1 Ethanolpräzipitationsmethode**

Die Bindung der Komplexe an die DNA wurde nach einer in der Literatur gefundenen Ethanolpräzipitationsmethode bestimmt [198]. Abb. 20-6 zeigt die Durchführung des Experiments schematisch zur besseren Übersicht.

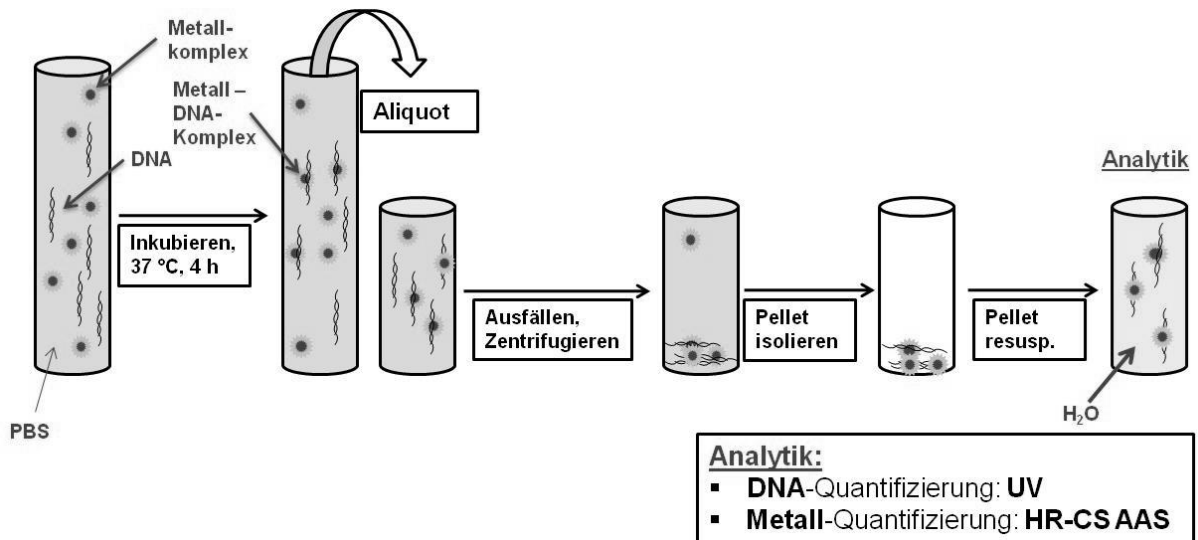


Abb. 20-6: Schematische Darstellung der Durchführung des DNA-Präzipitationsexperiments

### Durchführung

10 µL der zuvor hergestellten Substanzstammlösungen ( $c_{\text{Pt-Komplexe}} = 40 \text{ mM}$  bzw.  $c_{\text{Ti-Komplexe}} = 50 \text{ mM}$ ) wurden mit 90 µL Phosphatpuffer (pH 7,4) um den Faktor 10 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 µL zu 990 µL einer DNA-Stammlösung ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) gegeben und anschließend bei 37 °C im Inkubator unter ständigem Schütteln für 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zwei Aliquote von je 200 µL aus der Inkubationslösung entnommen und mit je 100 µL einer 0,9 molarer Natriumacetatlösung und 900 µL kaltem Ethanol (absolut) versetzt. Nach zweimaligen leichten Schwenken der Lösung wurde diese für 2 Stunden bei -21 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 Minuten mit 7167 g zentrifugiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden isoliert und in 300 µL einer 0,3 molaren Natriumacetatlösung resuspendiert. Nach Zugabe von 900 µL kaltem Ethanol (absolut) wurde erneut ausgefällt und ein zweites Mal unter denselben Bedingungen (4 °C, 10 min, 7167 g) zentrifugiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden isoliert, 2 mal mit kaltem Ethanol (absolut) gewaschen und bis zur weiteren Analytik bei -25 °C aufbewahrt.

### Analytik

Zur weiteren Analytik wurden die DNA-Pellets in 500 µL demineralisiertem Wasser resuspendiert und für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Die DNA-Konzentrationen der Proben wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Kalib-

rierung erfolgte mit einer frisch hergestellten, wässrigen DNA-Stammlösung mit einer Konzentration von 250 µg/mL. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen mit demineralisiertem Wasser verschiedene Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0 – 250 µg/mL hergestellt. Je 150 µL der Standardlösungen und je 150 µL der Proben wurden in je ein Loch einer 96-Lochplatte pipettiert und mit dem Mikroplattenlesegerät bei 260 nm vermessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergerade sollte größer als 0,99 sein, andernfalls wurde die Messung wiederholt. Mithilfe der Funktion der Kalibriergeraden konnte die DNA-Konzentration jeder Probe berechnet werden.

Die Metallkonzentration wurde mittels hochauflösender Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumsstrahler (HR-CS AAS) quantifiziert. Dazu wurden die verbleibenden 200 µL der Probensuspensionen mit 20 µL Triton®-X100 (1 %) und 20 µL HNO<sub>3</sub> (13 %) versetzt. Der Metallgehalt wurde mit der unter 20.2 beschriebenen Methode zur Metallquantifizierung bestimmt.

### **Auswertung**

Die Ergebnisse wurden als pmol Komplex je µg DNA angegeben und als Nukleosid/Substanz-Verhältnis unter Berücksichtigung des mittleren Molekulargewichts eines DNA-Nukleotidbruchstückes von 30,9 g/mol berechnet. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

#### **20.6.2 DNA-Schmelztemperaturmethode**

*Die Untersuchungen zur DNA-Interaktion mittels Schmelztemperaturmessung wurden am Institut für Anorganische Chemie der Ruhr-Universität Bochum im Arbeitskreis von Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte durchgeführt.*

Eine Lösung, die 60,6 µM ctDNA und 12,12 µM des zu untersuchenden Metallkomplexes enthält wurde in Phosphatpuffer (pH 7,4) hergestellt. Die Metallkomplexe wurden zuvor in DMF vorgelöst, so dass die Testlösung eine DMF-Konzentration von 0,7 % (v/v) aufwies. Bei der ctDNA-Konzentration handelt es sich um die Konzentration der DNA-Basen mit  $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Schmelzkurven wurden mit einem VARIAN Cary 100 mit einer computerkontrollierten 12 Küvetten-Peltier-Element und Temperatursensor unter Verwendung einer volumenreduzierten selbsthergestellten Quarzküvette von 1 cm Lichtweg bei einer Wellenlänge von 260 nm im *thermal*

mode der Gerätesoftware aufgenommen. Das Programm der Schmelzpunktmessungen ist in Tab. 20-9 dargestellt. Die Aufheiz- und Abkühlschritte wurden jeweils 2- bis 3-mal wiederholt. Zum Spülen wurde Stickstoff bei geringeren Temperaturen verwendet und die Proben wurden vor der Messung mit Stickstoff entgast.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte durch das Auftragen der gemessenen Absorption gegen die Temperatur. Anschließend wurde mit Hilfe der Software Origin ein polynomischer Fit 9. Grades sowie die 1. Ableitung dieses Fits erstellt. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) entspricht dem Maximum der Ableitung bei  $> 37^\circ\text{C}$  und wurde als Mittelwert aus 2 bis 3 aufgenommenen Schmelzpunktkurven berechnet.

**Tab. 20-9: Programm zur Aufnahme von ctDNA-Schmelzpunktkurven. Die Daten vom Aufheizen und Kühlen wurden zur Bestimmung der Schmelztemperatur verwendet.**

	Temperatur ( $^\circ\text{C}$ )	Geschwindigkeit ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ )	Halten (min)
<b>Denaturieren</b>	90		3
<b>Temperieren</b>	90 – 4	0,2	3
<b>Aufheizen</b>	4 – 90	0,5	3
<b>Kühlen</b>	90 – 4	0,5	3
	25	0,5	

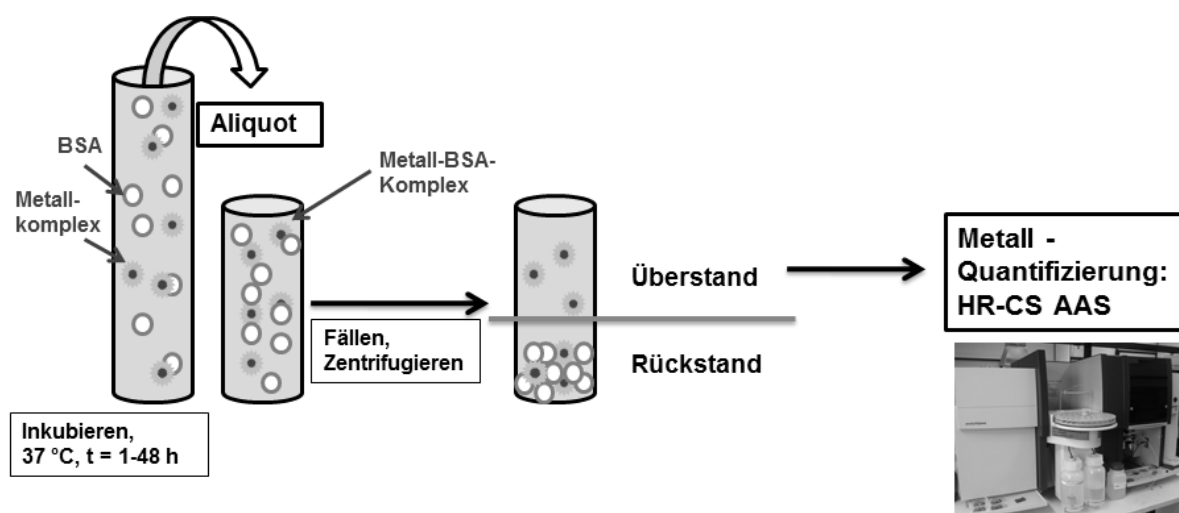
## 20.7 Proteinbindung

Das Bindevermögen der Metallkomplexe an Rinderserumalbumin (BSA) wurde nach einer in der Literatur gefundenen Ethanolpräzipitationsmethode, die in Abb. 20-7 schematisch dargestellt ist, bestimmt [197].

### Durchführung

440 mg BSA wurden in 11 mL serumfreies Zellkulturmedium gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 mL als Blindwert abgenommen und mit 1  $\mu\text{L}$  DMF versetzt. Zu den verbleibenden 10 mL wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 50 millimolaren Substanzstammlösung in DMF gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  unter regelmäßigem Umschwenken inkubiert. Zu defi-

nierten Zeitpunkten (1, 2, 4, 6, 10, 24, 30, 48 Stunden) wurde jeweils ein Aliquot von 250 µL aus der Lösung entnommen und sofort mit 500 µL kaltem Ethanol (absolut) versetzt. Die Proben wurden anschließend bei –25 °C für 2 Stunden aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren bei 2867 g für 5 Minuten bei 4 °C wurden 400 µL des Überstands abgenommen und mit 40 µL HNO<sub>3</sub> (13 %) zur Stabilisierung versetzt. Bis zur weiteren Analytik wurden die Proben bei -20 °C gelagert.



**Abb. 20-7: Schematische Darstellung der Durchführung des BSA-Ethanolpräzipitationsexperiments (BSA: Rinderserumalbumin)**

## Auswertung

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese mittels Atomabsorptionsspektrometrie (siehe 20.2) vermessen, um die ungebundene Metallkonzentration (M) zu quantifizieren. Zur Kalibrierung wurde die unbehandelte Inkubationslösung verwendet, aus der durch Verdünnen weitere Standards hergestellt wurden. Die Standardlösungen wurden ebenfalls durch HNO<sub>3</sub> (13 %) stabilisiert. Vor der Messung wurden zu jeder Lösung 10 % (v/v) Triton®-X100 (1 %) hinzugegeben. Unter der Annahme, dass 100 % des Proteins (BSA) ausgefällt wurden, konnte das ungebundene Metall in % wie folgt als Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten berechnet werden:

$$\text{Proteinbindung (\%)} = (1 - M) \times 100$$

**Formel 20-4: Berechnung der Proteinbindung**



## 20.8 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde nach der im Jahre 1976 von M. M. Bradford veröffentlichten Methode durchgeführt [251]. Es handelt sich dabei um eine einfach durchzuführende, sensitive Methode zur Quantifizierung von Proteinen im Mikrogramm-Bereich. Sie beruht im Wesentlichen auf einer Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Blue, welcher im Bradford-Reagenz (siehe 19.2) enthalten ist, mit einem Protein. Bei der Komplexbildung entsteht innerhalb von wenigen Minuten ein blau gefärbtes Produkt. Dieses Produkt ist für eine Stunde stabil und kann mittels einer Absorptionsmessung bei 595 nm photometrisch erfasst werden. Die Bestimmungsgrenzen liegen im Mikrogramm pro Milliliter-Bereich. Zu beachten ist, dass die üblichen Laborreagenzien Triton®- X100 und Natriumdodecylsulfat (SDS) falsch positive Ergebnisse liefern. Die Anwesenheit muss deshalb vor Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden.

### Durchführung

Das zuvor hergestellte Bradford-Reagenz wurde vor Gebrauch 5-fach mit demineralisiertem Wasser verdünnt. 200 µL dieser Lösung wurden mit je 10 µL Standard- oder Probelösung in je einem Loch einer 96-Lochplatte vermischt (siehe Abb. 20-8). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Standardlösungen wurde BSA in demineralisiertem Wasser im Konzentrationsbereich von 0 - 72 µg/L verwendet. Die Lösungen wurden nach 20 Minuten Inkubationszeit photometrisch bei 595 nm im Mikroplattenlesegerät vermessen.



Abb. 20-8: Schema zur Durchführung der Bradford-Methode

### Auswertung

Nach Mittelwertbildung aus den Doppelbestimmungen erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Kalibriergeraden. Die Kalibriergerade ergab sich nach linearer Regression

der Absorptionen der Standardlösungen aufgetragen gegen die Konzentration an Rinderserumalbumin (siehe Abb. 20-9). Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergerade sollte stets größer als 0,99 sein, andernfalls wurde die Messung wiederholt.

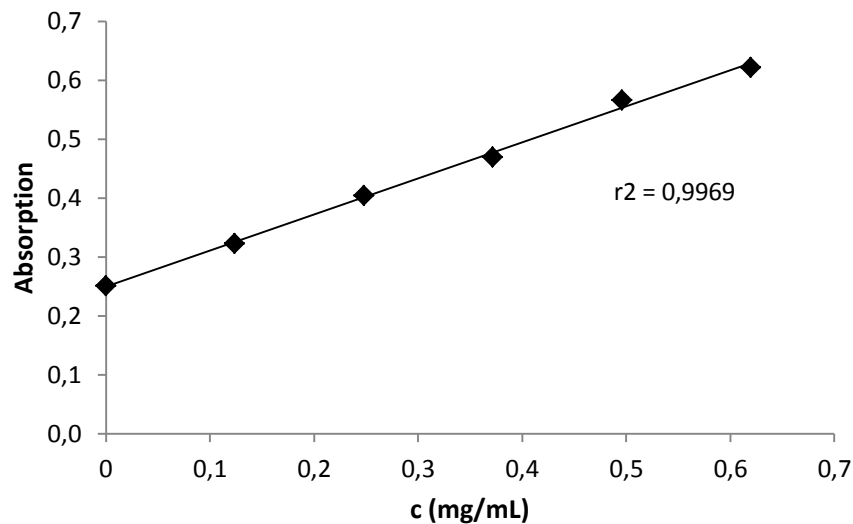
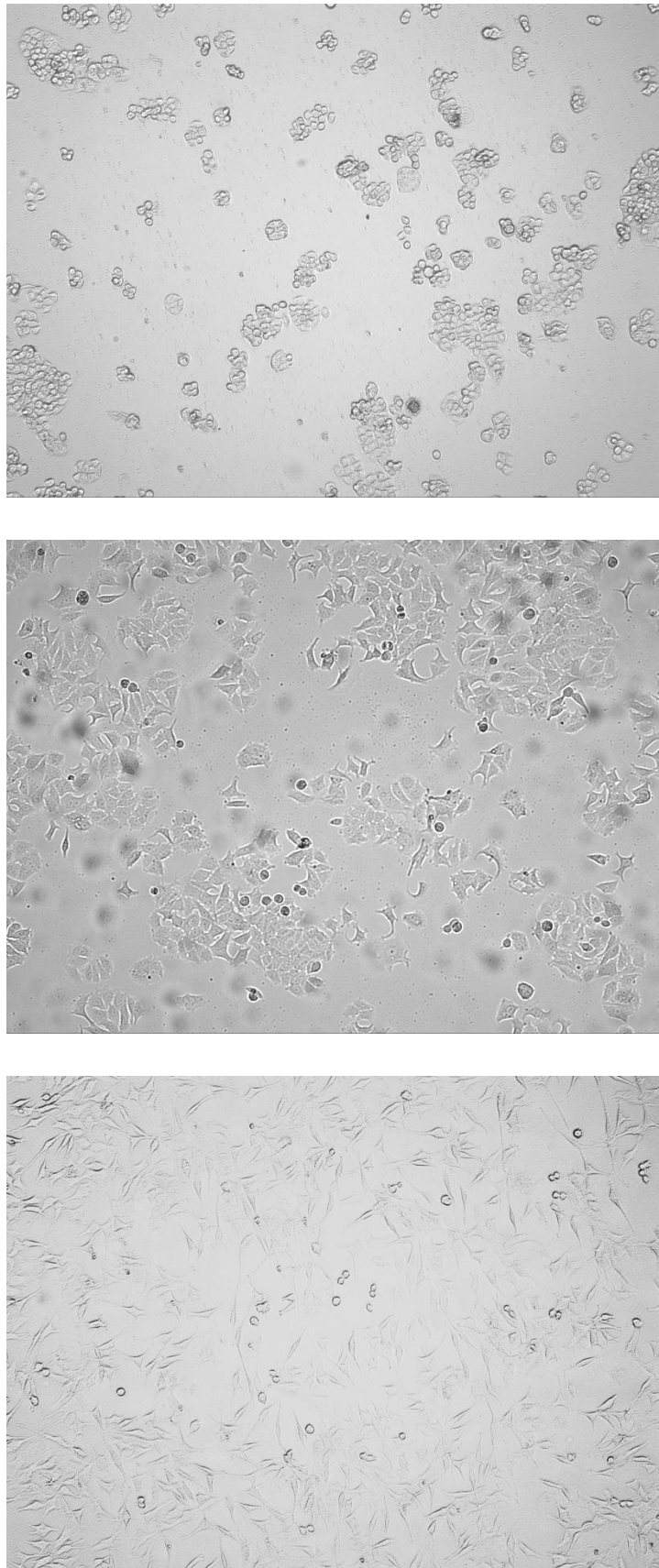


Abb. 20-9: Kalibriergerade mit BSA-Stammlösungen (BSA: Rinderserumalbumin)

## 20.9 Untersuchungen zur Bioverteilung

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Adhäsionskulturen, die alle in serumhaltigem Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert wurden. Die Passage der Zellen erfolgte wöchentlich. Von HT-29 wurden 0,5 mL für die Passage verwendet, von MCF-7 und L-929 jeweils 1,5 mL. Das Aussehen der Zellen ist anhand von Mikroskopaufnahmen (JuliBr Live Cell Analyzer, Peqlab Biotechnology GmbH) in Abb. 20-10 dargestellt und die Herkunft der Zelllinien ist im Folgenden aufgelistet:

- HT-29 Zellen: Humane Adenokarzinomzelllinie des Kolons, die aus einer 44-jährigen Frau isoliert wurden.
- MCF-7 Zellen: Humane Brustkarzinomzelllinie, die im Jahre 1970 aus einer 69-jährigen Frau isoliert wurden.
- L-929 Zellen: Mausfibroblasten, die von normalem adipotischen Gewebe einer männlichen C3H/An Maus isoliert wurden.



**Abb. 20-10: Mikroskopaufnahmen (96-fache Vergrößerung) von HT-29 Zellen (oben), MCF-7 Zellen (Mitte) und L-929 Zellen (unten)**

### **20.9.1 Zellaufnahmeuntersuchungen**

#### **Anzucht der Zellen**

HT-29 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für circa 1 Woche bis zu einer Konfluenz von 70-90 % angezüchtet. Nach dem Absaugen des Mediums wurde dieses durch 10 mL neues Medium, welches die zu testende Substanz in der gewünschten Konzentration enthielt, ersetzt. Die Flaschen wurden anschließend bei 38 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellkulturflaschen entnommen und das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und mit 2 mL Trypsinlösung versetzt, die gut verteilt und sofort wieder abgesaugt wurde. Zur Aktivierung des Trypsins wurden die Zellkulturflaschen erneut für 2-3 Minuten in den Inkubator gestellt. Die Zellen wurden abschließend in 10 mL Medium resuspendiert, in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3323 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und bis zur weiteren Analytik bei – 20 °C aufbewahrt. Für die Analytik wurden die Zellpellet in 1 mL demineralisiertem Wasser suspendiert und für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt.

#### **Proteinbestimmung**

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 20.8) wurde aus der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und 10-fach mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Je 10 µL dieser Suspensionen wurden mit 200 µL Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt mit demineralisiertem Wasser) in je einem Loch einer 96-Lochplatte gemischt und nach 20 Minuten photometrisch bei 590 nm vermessen. Zur Kalibrierung dienten frisch hergestellte Lösungen von BSA in demineralisiertem Wasser im Konzentrationsbereich von 0 -72 µg/L.

#### **Metallbestimmung**

Die Metallquantifizierung erfolgte mit der unter 20.2 beschriebenen Methode mittels Atomabsorptionsspektrometrie. Vor der Metallbestimmung wurden alle Proben auf denselben Proteingehalt mit demineralisiertem Wasser verdünnt, um Matrixeffekte des biologischen Materials auszuschließen. Je nach zu bestimmenden Metall wurden weitere Zusätze, wie unter 20.2.2 und 20.2.3 beschrieben, zu den Proben hinzugefügt.

## **Auswertung**

Von mindestens 2 unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert als nmol Metall pro mg zelluläres Protein (Zellprotein) berechnet. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Metallkonzentration geschätzt. Dazu wurden die Durchmesser der Zellen bestimmt, womit unter Annahme einer Kugelform das Volumen einer Zelle berechnet werden konnte. Unter Zuhilfenahme des mittleren Proteingehalts einer Zelle, der mittels Bradford-Methode (siehe 20.8) und Zählen der Zellen mit einer Zellzählkammer bestimmt werden konnte, wurde die intrazelluläre Metallkonzentration in  $\mu\text{mol}$  erhalten [184].

### **20.9.2 Isolierung von Zellkernen**

#### **Anzucht der Zellen**

Für die Isolierung der Zellkerne wurden HT-29 Zellen in 175  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezüchtet und mit 20 mM der Metallkomplexe für 2, 8 und 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zunächst die Zellen isoliert, indem mit 10 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und anschließend die Zellen vom Flaschenboden mit Hilfe einer Trypsinlösung gelöst wurden. Die Zellen wurden in 10 mL Zellkulturmedium (siehe 19.2) resuspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 3323 g wurde das Zellpellet erhalten, welches mit 1 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen wurde.

#### **Isolierung der Zellkerne**

Nach Zusatz von 1 mL physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) wurde ein Aliquot von 200  $\mu\text{L}$  zur bestimmten der totalen Metallkonzentration in der Zelle entnommen. Die verbleibenden 800  $\mu\text{L}$  wurden bei 923 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die gereinigten Pellets wurden in 300  $\mu\text{L}$  Isolationslösung 1 (siehe 19.2) resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nachdem die Eppendorfgefäße 10 Minuten in ein Eisbad gestellt wurden, was dem Vorquellen der Zellen diente, wurde bei 1231 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das isolierte Pellet wurde in 300  $\mu\text{L}$  Isolationslösung 2 (siehe 19.2) aufgenommen und mit Hilfe eines Homogenisators durch 15-malige Auf- und Abbewegung homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 3583 g für 5 Minuten zentrifugiert und die so isolierten Zellkerne in 150  $\mu\text{L}$  Saccharose-Lösung 1 (siehe 19.2) aufgenommen. Es wurde mit 150  $\mu\text{L}$  Saccharose-Lösung 2 (siehe 19.2) unterschich-

tet und bei 3583 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die isolierten Zellkerne wurden in 200 µL EDTA-Lösung suspendiert und bis zur weiteren Analytik bei – 20 °C aufbewahrt.

### **Proteinbestimmung**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellkernen wurden die Proben unverdünnt mittels der Bradford-Methode (siehe 20.8) untersucht. Die Proben zur Bestimmung der totalen zellulären Metallkonzentration wurden vorher in 200 µL demineralisiertem Wasser suspendiert und 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde ein Aliquot entnommen, das vor der Proteinquantifizierung 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt wurde.

### **Metallbestimmung**

Die Metallkonzentration in den Zellkern- und Gesamtzellproben wurde mit der zuvor entwickelten HR-CS AAS-Methode (siehe 20.2) bestimmt. Dazu wurden alle Proben auf denselben Proteingehalt mit demineralisiertem Wasser bzw. EDTA-Lösung verdünnt. Die Kalibrierung erfolgte mit dem untersuchten Metallkomplex.

### **Auswertung**

Die Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Experimenten in nmol Metall pro mg Kern- bzw. Zellprotein.

## **20.9.3 Isolierung von Mitochondrien**

### **Anzucht**

Für die Isolierung der Mitochondrien wurden HT-29 Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezüchtet und mit 20 mM der Metallkomplexe für 2, 8 und 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zunächst die Zellen gewonnen, indem mit 10 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen wurde und anschließend mit Trypsinlösung die Zellen vom Flaschenboden gelöst wurden. Die Zellen wurden in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 3323 g für 5 Minuten wurde das Zellpellet erhalten, welches mit 1 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen wurde.

## Isolierung der Mitochondrien

Für die Isolierung der Mitochondrien wurde ein von Sigma Aldrich käuflich erworbenes Kit (MITOISO2, Chargenbezeichnung 050M4042) verwendet. Dazu wurde das erhaltene Zellpellet in 10 mL kaltem Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert und die Zellen wurden mit Hilfe einer Zählkammer (siehe 19.1) gezählt. Es wurde aus dieser Lösung ein Aliquot von 2 mL zur Bestimmung der totalen zellulären Metallkonzentration entnommen. Die verbleibenden 8 mL wurden für 5 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand erneut mit Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen. Abhängig von der Zellzahl je Probe wurde der Rückstand in einem definiertem Volumen Extraktionspuffer aufgenommen (siehe Tab. 20-10) und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Für die Durchführung eines erfolgreichen Experiments war eine Mindestzellzahl von 20.000.000 erforderlich.

**Tab. 20-10: Bestimmung des Extraktionspuffervolumens**

<b>Zellzahl (<math>\times 10^5</math>)</b>	<b>200</b>	<b>250</b>	<b>300</b>	<b>350</b>	<b>400</b>	<b>450</b>	<b>500</b>
<b>Extraktionspuffer (mL)</b>	1,25	1,50	1,75	2,00	2,50	3,00	3,50

Anschließend wurde mit einem Homogenisator durch 25-malige Auf- und Abbewegungen ein Homogenisat erhalten, das in ein Eppendorfgefäß (1,5 mL) überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 600 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß (1,5 mL) überführt und nochmals für 10 Minuten bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Die so isolierten Mitochondrien wurden in 100 µL Aufbewahrungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt.

## Proteinbestimmung

Die Mitochondrienproteine und der Zellproteingehalt wurden mit der unter 20.8 beschriebenen Bradford-Methode quantifiziert. Dazu wurden die Mitochondrienproben unverdünnt verwendet. Die Proben zur Bestimmung der totalen Zellaufnahme wurden in 1 mL demineralisiertem Wasser suspendiert, für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt und vor der Versuchsdurchführung 1:10 mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

## **Metallbestimmung**

Die Metallkonzentration in den Proben wurden mit der unter 20.2 beschriebenen HR-CS AAS Methode bestimmt. Die Mitochondrienproben wurden vor der Messung auf denselben Proteingehalt mit Aufbewahrungspuffer (siehe 19.2) verdünnt und mit 10 % (v/v) Triton®-X100 (1 %) versetzt.

## **Auswertung**

Die Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Experimenten in nmol Metall pro mg Mitochondrien- bzw. Zellprotein.

## **20.10 Enzymhemmung**

Die Effekte der Metallkomplexe auf die Enzyme Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase konnte in einem *in situ*-Inhibitionsexperiment bestimmt werden. Dazu wurde eine zuvor publizierte Methode, die auf einer UV-Messung im Mikroplattenlesegerät basiert, verwendet [51, 248, 252].

## **Durchführung**

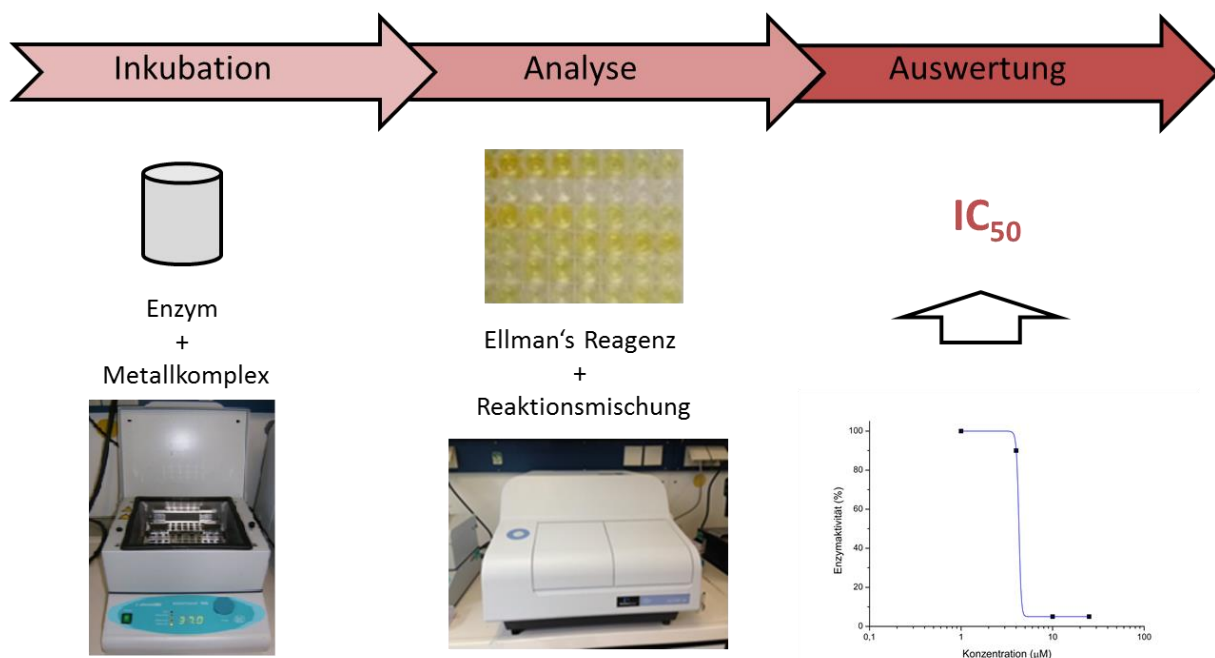
Das Enzym Thioredoxinreduktase (Sigma Aldrich), isoliert aus der Leber einer Ratte, wurde vor der Verwendung mit demineralisiertem Wasser auf eine Konzentration von 2,5 U/mL verdünnt. Das Enzym Glutathionreduktase (Sigma Aldrich), isoliert aus einer Hefe, wurde ebenfalls mit demineralisiertem Wasser auf eine Konzentration von 4 U/mL verdünnt. Die zu testenden Metallkomplexe wurden vor Versuchsdurchführung als Stammlösungen frisch in DMF gelöst. Die Stammlösungen dienten anschließend zur Herstellung weiterer Lösungen durch Verdünnen mit DMF im Konzentrationsbereich von 0,05 mM bis 25 mM. Diese Lösungen wurden wiederum mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) 1:100 verdünnt, so dass Endkonzentrationen von 0,5 - 250  $\mu$ M (DMF-Endkonzentration: 0,05 % v/v) erzielt wurden. Zu je 25  $\mu$ L einer Enzymlösung wurden 25  $\mu$ L dieser Substanzlösungen gegeben. Dafür wurde eine 96-Lochplatte verwendet, die anschließend unter Schütteln bei 37 °C für 75 Minuten inkubiert wurde. Es wurde zusätzlich ein Blindwert, eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle wie in Tab. 20-11 beschrieben vorbereitet. Für die Negativkontrolle wurde nur die Substanzlösung mit der höchsten Testkonzentration verwendet.



Tab. 20-11: Übersicht über die Herstellung der verschiedenen Testlösungen

	Enzymlösung	Puffer bzw. DMF/Puffer	Substanzlösung
<b>Blindwert</b>	-	50 $\mu\text{L}$	-
<b>Negativkontrolle</b>	-	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
<b>Positivkontrolle</b>	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	-
<b>Testsubstanzen</b>	25 $\mu\text{L}$	-	25 $\mu\text{L}$

Nach der Inkubation wurden in jedes Loch der 96-Lochplatte 225  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung und 25  $\mu\text{L}$  einer DTNB-Lösung (Ellman's Reagenz, siehe 19.2) gegeben. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden die Lösungen gut miteinander vermischt und sofort bei einer Wellenlänge von 405 nm im Intervall von 10 Sekunden über einen Zeitraum von 6 Minuten im Mikroplattenlesegerät vermessen. Die Durchführung des Experiments ist zur besseren Übersicht schematisch in Abb. 20-11 dargestellt.

Abb. 20-11: Schema zur Durchführung des *in situ*-Enzyminhibitionsexperiments

## **Auswertung**

Der Test konnte nur ausgewertet werden, wenn die Absorptionswerte des Blindwertes und der Negativkontrolle keine Abweichungen aufwiesen, da andernfalls die Testsubstanz mit den verwendeten Reagenzien reagiert hätte (Negativkontrolle). Außerdem sollte der Anstieg der 5-Thionitrobenzoesäure-Konzentration über die Zeit linear verlaufen ( $r^2 > 0,99$ ). Die Enzymaktivität konnte über die Steigung der aufgenommenen Geraden (Absorptionserhöhung pro Sekunde) berechnet werden. Zunächst wurde von allen Absorptionswerten der Blindwert subtrahiert und anschließend die Geradensteigung (Absorption gegen Zeit) der Testsubstanz durch die Geradensteigung (Absorption gegen Zeit) der Positivkontrolle dividiert und mit 100 multipliziert. Mit Hilfe des Programms Origin und einem sigmoidalen Fit (Boltzmann- oder Hill-Funktion) konnte aus den errechneten Prozentwerten der  $IC_{50}$ -Wert berechnet werden, in dem die Prozentwerte gegen die Testkonzentrationen logarithmisch aufgetragen wurden. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Substanzkonzentration, bei der die Enzymaktivität um 50 % gehemmt wurde. Dieser Wert wurde als Mittelwert mit Standardabweichung von mindestens 2 unabhängigen Experimenten angegeben.

## VI Literaturverzeichnis

- [1] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature* 205 (1965) 698–699.
- [2] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents, *Nature* 222 (1969) 385–386.
- [3] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, New trends for metal complexes with anticancer activity, *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (2008) 197–206.
- [4] B. Desoize, Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment, *Anticancer Research* 24 (2004) 1529–1544.
- [5] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Antitumour metal compounds: more than theme and variations, *Dalton Transactions* (2007) 183–194.
- [6] I. Ott, R. Gust, Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika, *Pharmazie in unserer Zeit* 35 (2006) 124–133.
- [7] S.H. van Rijt, P.J. Sadler, Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discovery Today* 14 (2009) 1089–1097.
- [8] Deutsche Krebshilfe e.V., Deutsche Krebshilfe e.V.: Krebszahlen, 2014, <http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html>, accessed 29 Januar 2014.
- [9] B.W. Stewart, C.P. Wild, World Cancer Report 2014, WHO Press, World Health Organization 2014, Genf, 2014.
- [10] D. Williams, Bioinorganic drugs-1, *Journal of Chemistry Education* (1974) 124–127.
- [11] P. Ehrlich, Über die Behandlung der Syphilis mit dem Ehrlichschen Präparat 606, *Berliner klinische Wochenschrift* 43 (1910) 1996–1999.
- [12] A. Fleming, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology* 10 (1929) 226–236.

- [13] W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson, Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action, *Journal of Organometallic Chemistry* 696 (2011) 989–998.
- [14] E. Alessio, *Bioinorganic medicinal chemistry*, Wiley-VCH; John Wiley, Weinheim, Chichester, 2011.
- [15] A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs, *Dalton Transactions* 40 (2011) 7817–7823.
- [16] M. Guo, Z. Guo, P. Sadler, Titanium(IV) targets phosphoesters on nucleotides: implications for the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6 (2001) 698–707.
- [17] H. Koepf, P. Koepf-Maier, Titanocen-dichlorid - das erste Metallocen mit cancerostatischer Wirksamkeit, *Angewandte Chemie* 91 (1979) 509.
- [18] B.K. Keppler, C. Friesen, H.G. Moritz, H. Vongerichten, E. Vogel, Tumor-inhibiting bis( $\beta$ -diketonato) metal complexes. Budotitane, cis-diethoxybis(1-phenylbutane-1,3-dionato)titanium(IV), *Structure and Bonding* 78 (1991) 97–127.
- [19] M.J. Clarke, F. Zhu, D.R. Frasca, Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals, *Chemical Reviews* 99 (1999) 2511–2534.
- [20] T. Schilling, K.B. Keppler, M.E. Heim, G. Niebch, H. Dietzfelbinger, J. Rastetter, A.-R. Hanauske, Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane, *Investigational New Drugs* 13 (1996) 327–332.
- [21] E. Meléndez, Titanium complexes in cancer treatment, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 (2002) 309–315.
- [22] T.J. Kealy, P.L. Pauson, A new type of organo-iron compound, *Nature* 168 (1951) 1039–1040.
- [23] P. Koepf-Maier, Complexes of metals other than platinum as antitumour agents, *European Journal of Clinical Pharmacology* 47 (1994) 1–16.
- [24] A. Harstrick, H.J. Schmoll, G. Sass, H. Poliwoda, Y. Rustum, Titanocendichloride activity in cisplatin and doxorubicin-resistant human ovarian carcinoma cell lines, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 29A (1993) 1000–1002.
- [25] P. Koepf-Maier, H. Koepf, Non-platinum group metal antitumor agents. History, current status, and perspectives, *Chemical Reviews* 87 (1987) 1137–1152.

- [26] G. Lummen, H. Sperling, H. Luboldt, T. Otto, H. Rubben, Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 42 (1998) 415–417.
- [27] C.V. Christodoulou, D.R. Ferry, D.W. Fyfe, A. Young, J. Doran, Sheehan, T. M. T., A. Eliopoulos, K. Hale, J. Baumgart, G. Sass, Phase I Trial of Weekly Scheduling and Pharmacokinetics of Titanocene Dichloride in Patients With Advanced Cancer 16 (1998) 2761–2769.
- [28] A. Korfel, M.E. Scheulen, H.J. Schmoll, O. Grundel, A. Harstick, M. Knoche, L.M. Fels, M. Skorzec, F. Bach, J. Baumgart, Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Titanocene Dichloride in Adults with Advanced Solid Tumors, *Clinical Cancer Research* 4 (1998) 2701–2708.
- [29] J.H. Toney, T.J. Marks, Hydrolysis Chemistry of the Metallocene Dichlorides  $M(r5-C5H5)zC12M$ ,  $M = Ti, V, Zr$ . Aqueous Kinetics, Equilibria, and Mechanistic Implications for a New Class of Antitumor Agents, *Journal of the American Chemical Society* 107 (1985) 947–953.
- [30] N.J. Sweeney, O. Mendoza, H. Müller-Bunz, C. Pampillón, F.-J.K. Rehmann, K. Strohfeldt, M. Tacke, Novel benzyl substituted titanocene anti-cancer drugs, *Journal of Organometallic Chemistry* 690 (2005) 4537–4544.
- [31] J. Claffey, H. Müller-Bunz, M. Tacke, Benzyl-substituted titanocene dichloride anticancer drugs: From lead to hit, *Journal of Organometallic Chemistry* 695 (2010) 2105–2117.
- [32] I. Fichtner, D. Behrens, J. Claffey, A. Deally, B. Gleeson, S. Patil, H. Weber, M. Tacke, The Antiangiogenic and Antitumoral Activity of Titanocene Y\* In Vivo, *Letters in Drug Design & Discovery* 8 (2011) 302–307.
- [33] I. Fichtner, C. Pampillon, N. Sweeney, K. Strohfeldt, M. Tacke, Anti-tumor activity of Titanocene Y in xenografted Caki-1 tumors in mice, *Anti-Cancer Drugs* 17 (2006) 333–336.
- [34] J.H. Bannon, I. Fichtner, A. O'Neill, C. Pampillón, N.J. Sweeney, K. Strohfeldt, R.W. Watson, M. Tacke, M.M. Mc Gee, Substituted titanocenes induce caspase-dependent apoptosis in human epidermoid carcinoma cells in vitro and exhibit antitumour activity in vivo, *British Journal of Cancer* 97 (2007) 1234–1241.

- [35] P. Beckhove, O. Oberschmidt, A. Hanauske, C. Pampillon, V. Schirrmacher, N. Sweeney, K. Strohfeldt, M. Tacke, Antitumor activity of Titanocene Y against freshly explanted human breast tumor cells and in xenografted MCF-7 tumors in mice, *Anti-Cancer Drugs* 18 (2007) 311–315.
- [36] C. Dowling, J. Claffey, S. Cuffe, I. Fichtner, C. Pampillon, N.J. Sweeney, K. Strohfeldt, Watson, R. W. G., M. Tacke, Antitumor Activity of Titanocene Y in Xenografted PC3 Tumors in Mice, *Letters in Drug Design & Discovery* 5 (2008) 141–144.
- [37] E.Y. Tshuva, J.A. Ashenhurst, Cytotoxic Titanium(IV) Complexes: Renaissance, *European Journal of Inorganic Chemistry* 2009 (2009) 2203–2218.
- [38] K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, C. Adin, Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications, *Veterinary and Comparative Oncology* 6 (2008) 1–18.
- [39] S.R. McWhinney, R.M. Goldberg, H.L. McLeod, Platinum neurotoxicity pharmacogenetics, *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (2009) 10–16.
- [40] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Current Opinion in Chemical Biology* 7 (2003) 481–489.
- [41] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Pérez, Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance, *Chemical Reviews* 103 (2003) 645–662.
- [42] E. Szuromi, P.R. Sharp, Alkene Coupling through Triflic Acid Elimination on Platinum(II), *Organometallics* 25 (2006) 558–559.
- [43] A. Klein, K.-W. Klinkhammer, T. Scheiring, Cyclooctadienemethylplatinum complexes: synthesis, reactivity, molecular structure and spectroscopic properties of the organometallic hydroxoplatinum(II) complex [(COD)PtMe(OH)], *Journal of Organometallic Chemistry* 592 (1999) 128–135.
- [44] A. Klein, A. Lüning, I. Ott, L. Hamel, M. Neugebauer, K. Butsch, V. Lingen, F. Heinrich, S. Elmas, Organometallic palladium and platinum complexes with strongly donating alkyl coligands – Synthesis, structures, chemical and cytotoxic properties, *Journal of Organometallic Chemistry* 695 (2010) 1898–1905.

- [45] A. Klein, T. Schurr, H. Scherer, N.S. Gupta, Cytosine Binding in the Novel Organoplatinum(II) Complex [(COD)PtMe(cytosine)](SbF<sub>6</sub>), *Organometallics* 26 (2007) 230–233.
- [46] K. Butsch, S. Elmas, N.S. Gupta, R. Gust, F. Heinrich, A. Klein, Y. von Mering, M. Neugebauer, I. Ott, M. Schaefer, H. Scherer, T. Schurr, Organoplatinum(II) and -palladium(II) Complexes of Nucleobases and Their Derivatives, *Organometallics* 28 (2009) 3906–3915.
- [47] C. Mock, I. Puscasu, M.J. Rauterkus, G. Tallen, J.E. Wolff, B. Krebs, Novel Pt(II) anticancer agents and their Pd(II) analogues: syntheses, crystal structures, reactions with nucleobases and cytotoxicities, *Inorganica Chimica Acta* 319 (2001) 109–116.
- [48] S. Komiya, Y. Mizuno, T. Shibuya, Interaction of organotransition metals with nucleosides. Preparation and properties of methyl(1,5-cyclooctadiene) (nucleoside) platinum(II)<sup>+</sup>, *Chemistry Letters* 7 (1986) 1065–1068.
- [49] C. Cullinane, G.B. Deacon, P.R. Drago, T.W. Hambley, K.T. Nelson, L.K. Webster, Preparation and cell growth inhibitory activity of [PtR<sub>2</sub>L<sub>2</sub>] (R=polyfluorophenyl, L<sub>2</sub>=diene, cyclohexane-1,2-diamine (chxn) or cis-(dimethyl sulfoxide)<sub>2</sub>) and the X-ray crystal structure of [Pt(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>2</sub>(cis-chxn)], *Journal of Inorganic Biochemistry* 89 (2002) 293–301.
- [50] C. Wetzel, P.C. Kunz, M.U. Kassack, A. Hamacher, P. Böhler, W. Watjen, I. Ott, R. Rubbiani, B. Spingler, Gold(I) complexes of water-soluble diphos-type ligands: Synthesis, anticancer activity, apoptosis and thioredoxin reductase inhibition, *Dalton Transactions* 40 (2011) 9212–9220.
- [51] R. Rubbiani, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, A. Kitanovic, L.A. Onambele, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W.S. Sheldrick, G. Wolber, A. Prokop, S. Wölfl, I. Ott, Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties, *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (2010) 8608–8618.
- [52] A. Meyer, A. Gutiérrez, I. Ott, L. Rodríguez, Phosphine-bridged dinuclear gold(I) alkynyl complexes: Thioredoxin reductase inhibition and cytotoxicity, *Inorganica Chimica Acta* 398 (2013) 72–76.

- [53] A. Meyer, C.P. Bagowski, M. Kokoschka, M. Stefanopoulou, H. Alborzinia, S. Can, D.H. Vlecken, W.S. Sheldrick, S. Wölfl, I. Ott, On the Biological Properties of Alkynyl Phosphine Gold(I) Complexes, *Angewandte Chemie International Edition* 51 (2012) 8895–8899.
- [54] J.A. Lessa, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C. Mendes, N.L. Speziali, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity, *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 1729–1739.
- [55] K. Yan, C.-N. Lok, K. Bierla, C.-M. Che, Gold(i) complex of N,N'-disubstituted cyclic thiourea with in vitro and in vivo anticancer properties—potent tight-binding inhibition of thioredoxin reductase, *Chemical Communications* 46 (2010) 7691–7844.
- [56] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* 175 (1972) 720–731.
- [57] C. Biele, H.R. Horton, *Biochemie*, 4. aktualisierte Aufl., Pearson Studium, München u.a., 2008.
- [58] S. Sundelacruz, M. Levin, D.L. Kaplan, Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation, *Stem Cell Reviews and Reports* 5 (2009) 231–246.
- [59] K.H. Bauer, J. Breitzkreutz, *Pharmazeutische Technologie: Mit Einführung in die Biopharmazie*, 9. völlig neu bearb. und erw. Aufl, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2012.
- [60] S. Pfeifer, *Grundlagen der Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation*, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Fla, 1984.
- [61] B. Gupta, T. Levchenko, V. Torchilin, Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 637–651.
- [62] A. Joliot, A. Prochiantz, Transduction peptides: from technology to physiology, *Nature Cell Biology* 6 (2004) 189–196.



- [63] E. Snyder, S. Dowdy, Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery, *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 389–393.
- [64] D. Steinhilber, H.J. Roth, M. Schubert-Zsilavecz, *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*, Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart, 2005.
- [65] J.D. Watson, F.H. Crick, Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* 171 (1953) 737–738.
- [66] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005) 307–320.
- [67] A. Gelasco, S.J. Lippard, NMR Solution Structure of a DNA Dodecamer Duplex Containing a cis-Diammineplatinum(II) d(GpG) Intrastrand Cross-Link, the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin, *Biochemistry* 37 (1998) 9230–9239.
- [68] P. Yang, M. Guo, Interactions of organometallic anticancer agents with nucleotides and DNA, *Coordination Chemistry Reviews* 185-186 (1999) 189–211.
- [69] P. Yang, M. Guo, Interaction of some non-platinum metal anticancer complexes with nucleotides and dna and the two-pole complementary principle (tpcp) arising therefrom, *Coordination Chemistry Reviews* 5 (1998) 189–211.
- [70] J.H. Murray, M.M. Harding, Organometallic Anticancer Agents: The Effect of the Central Metal and Halide Ligands on the Interaction of Metallocene Dihalides  $\text{Cp}_2\text{MX}_2$  with Nucleic Acid Constituents 37 (1994) 1936–1941.
- [71] Z. Zhang, P. Yang, M. Guo, H. Wang, Effect of titanocene dichloride coordination on Watson-Crick base pairing, *Journal of Inorganic Biochemistry* 63 (1996) 183–190.
- [72] Z. Zhang, P. Yang, M. Guo, Study of interactions between titanocene dichloride and mononucleotides by high-resolution  $^1\text{H}$ - and  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance, *Transition Metal Chemistry* 21 (1996) 322–326.
- [73] M. Kokoschka, Iridium(III)- und Rhodium(III)-haltige DNA (Bis-)Interkalatoren Synthese und Analyse der DNA-Wechselwirkung durch experimentelle Methoden und Molecular Modeling, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, 2011.
- [74] A. Frodl, D. Herebian, W.S. Sheldrick, Coligand tuning of the DNA binding properties of bioorganometallic ( $\eta^6$ -arene)ruthenium(ii) complexes of the type  $[(\eta^6-$

- arene)Ru(amino acid)(dppz)]<sup>n+</sup> (dppz = dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine), n=1-3, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (2002) 3664–3673.
- [75] R. Bieda, I. Ott, M. Dobroschke, A. Prokop, R. Gust, W.S. Sheldrick, Structure–activity relationships and DNA binding properties of apoptosis inducing cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes containing the cyclic thioether [9]aneS<sub>3</sub>, *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 698–708.
- [76] M. Kokoschka, J.-A. Bangert, R. Stoll, W.S. Sheldrick, Sequence-Selective Organoiridium DNA Bis-Intercalators with Flexible Dithiaalkane Linker Chains, *European Journal of Inorganic Chemistry* 2010 (2010) 1507–1515.
- [77] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas Biochemie des Menschen*, 4. vollst. überarb. und erw. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 2009.
- [78] J. Rotruck, A. Pope, A. Swanson, D. Hafeman, W. Hoekstra, Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase, *Science* 179 (1973) 588–590.
- [79] G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A.V. Lobanov, O. Zehta, R. Guigo, V.N. Gladyshev, Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300 (2003) 1439–1443.
- [80] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function, *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003) 4742–4758.
- [81] R.J. Hondal, S.M. Marino, V.N. Gladyshev, Selenocysteine in Thiol/Disulfide-Like Exchange Reactions, *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (2013) 1675–1689.
- [82] T.C. Laurent, E.C. Moore, P. Reichard, Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides, *Journal of Biological Chemistry* 239 (1964) 3436–3444.
- [83] V.N. Gladyshev, K.-T. Jeang, T.C. Stadtman, Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996) 6146–6151.
- [84] T. Tamura, T. Stadtman, A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996) 1006–1011.

- [85] M. Pia Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M. Agostina Cinellu, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions, *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 (2004) 1634–1641.
- [86] G.E. Briggs, J.B. Haldane, A Note on the Kinetics of Enzyme Action, *Biochemical Journal* 19 (1925) 338–339.
- [87] K.A. Johnson, R.S. Goody, The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper, *Biochemistry* 50 (2011) 8264–8269.
- [88] H. Lineweaver, D. Burk, Determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American Chemical Society* 56 (1934) 658–666.
- [89] Y. Liu, G. Fiskum, D. Schubert, Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain, *Journal of Neurochemistry* (2002) 780–787.
- [90] H. Sies, Strategies of antioxidant defense, *European Journal of Biochemistry* 215 (1993) 213–219.
- [91] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function, *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003) 4742–4758.
- [92] A. Gupte, R.J. Mumper, Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment, *Cancer Treatment Reviews* 35 (2009) 32–46.
- [93] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (2009) 579–591.
- [94] A. Holmgren, Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, *Journal of Biological Chemistry* 264 (1986) 13963–13966.
- [95] A. Holmgren, Thioredoxin, *Annual Review of Biochemistry* (1985) 237–271.
- [96] E.S. Arnér, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *European Journal of Biochemistry* 267 (2000) 6102–6109.
- [97] L. Zhong, E. Arnér, A. Holmgren, Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiolyselenen-

- p>
ysulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence, Proceedings of the National Academy of Sciences 97 (2000) 5854–5859.
- [98] S. Gromer, S. Urig, K. Becker, The thioredoxin system-From science to clinic, Medicinal Research Reviews 24 (2004) 40–89.
- [99] E. Arnér, H. Sarioglu, F. Lottspeich, A. Holmgren, A. Böck, High-level Expression in Escherichia coli of Selenocysteine-containing Rat Thioredoxin Reductase Utilizing Gene Fusions with Engineered Bacterial-type SECIS Elements and Co-expression with the SelA, SelB and SelC Genes, Journal of Molecular Biology 292 (1999) 1003–1016.
- [100] G. Waksman, T.S. Krishna, C. Williams Jr, J. Kuriyan, Crystal Structure of Escherichia coli Thioredoxin Reductase Refined at 2Å Resolution, Journal of Molecular Biology 236 (1994) 800–816.
- [101] T. Sandalova, L. Zhong, Y. Lindqvist, A. Holmgren, G. Schneider, Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme, Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (2001) 9533–9538.
- [102] L. Zhong, Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations, Journal of Biological Chemistry 275 (2000) 18121–18128.
- [103] M. Berggren, A. Gallegos, J. Gasdaska, G. Powis, Cellular thioredoxin reductase activity is regulated by selenium, Anticancer Research 17 (1997) 3377–3380.
- [104] D.F.D. Mahmood, A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet, M. Rouis, The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease, Antioxidants & Redox Signaling 19 (2013) 1266–1303.
- [105] Y. Matsuzaka, K. Okamoto, T. Mabuchi, M. Iizuka, A. Ozawa, A. Oka, G. Tamiya, J.K. Kulski, H. Inoko, Identification and characterization of novel variants of the thioredoxin reductase 3 new transcript 1 *TXNRD3NT1*, Mammalian Genome 16 (2005) 41–49.
- [106] R. Thieme, E. Pai, R. Schirmer, G. Schulz, Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution, Journal of Molecular Biology 152 (1981) 763–782.

- [107] G. Schulz, R. Schirmer, W. Sachsenheimer, E. Pai, The structure of the flavoenzyme glutathione reductase, *Nature* 273 (1978) 120–124.
- [108] C.M. Ithayaraja, Mini-Review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 9 (2011) 104–115.
- [109] G.E. Arteel, K. Briviba, H. Sies, Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen, *Chemical Research in Toxicology* 12 (1999) 264–269.
- [110] D.T. Lincoln, E.M. Ali Emadi, K.F. Tonissen, F.M. Clarke, The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer, *Anticancer Research* 23 (2003) 2425–2433.
- [111] Y. Muro, Y. Ogawa, Y. Kato, M. Hagiwara, Autoantibody to Thioredoxin Reductase in an Ovarian Cancer Patient, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242 (1998) 267–271.
- [112] S. Gromer, J.H. Gross, Methylseleninate Is a Substrate Rather Than an Inhibitor of Mammalian Thioredoxin Reductase. Implications for the Antitumor effects of Selenium., *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 9701–9706.
- [113] T. Boulikas, M. Vougiouka, Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs, *Oncology Reports* 11 (2004) 559–595.
- [114] S. Urig, K. Becker, On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology* 16 (2006) 452–465.
- [115] S. Gromer, D. Arscott, H. Charles, R. Williams Jr, H. Schirmer, K. Becker, Human Placenta Thioredoxin Reductase. Isolation of the Selenoenzyme, Steady State Kinetics, and Inhibition by therapeutic Gold compounds, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 20096–20101.
- [116] C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M.P. Rigobello, Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *Free Radical Biology and Medicine* 42 (2007) 872–881.

- [117] V. Milacic, D. Fregona, Q.P. Dou, Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs, *Histology and Histopathology* 23 (2008) 101–108.
- [118] D. Douer, M.S. Tallman, Arsenic trioxide: New clinical experience with an old medication in hematologic malignancies, *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005) 2396–2410.
- [119] J. Lu, E.-H. Chew, A. Holmgren, Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007) 12288–12293.
- [120] S.I. Hashemy, Motexafin Gadolinium, a Tumor-selective Drug Targeting Thioredoxin Reductase and Ribonucleotide Reductase, *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 10691–10697.
- [121] D. Magda, R.A. Miller, Motexafin gadolinium: A novel redox active drug for cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology* 16 (2006) 466–476.
- [122] J. Nordberg, Mammalian Thioredoxin Reductase Is Irreversibly Inhibited by Dinitrohalobenzenes by Alkylation of Both the Redox Active Selenocysteine and Its Neighboring Cysteine Residue, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 10835–10842.
- [123] P. Terheyden, A.-K. Kortüm, H.-J. Schulze, B. Durani, R. Remling, C. Mauch, V. Junghans, D. Schadendorf, U. Beiteke, M. Jünger, J.C. Becker, E.-B. Bröcker, Chemoimmunotherapy for cutaneous melanoma with dacarbazine and epifocal contact sensitizers: results of a nationwide survey of the German Dermatologic Co-operative Oncology Group, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133 (2007) 437–444.
- [124] E.S. Arnér, H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren, G. Spyrou, Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex, *Free Radical Biology and Medicine* 31 (2001) 1170–1178.
- [125] T. Sasada, H. Nakamura, S. Ueda, N. Sato, Y. Kitaoka, Y. Gon, A. Takabayashi, G. Spyrou, A. Holmgren, J. Yodoi, Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-

- diamminedichloroplatinum (II), *Free Radical Biology and Medicine* 27 (1999) 504–514.
- [126] A.-B. Witte, K. Anestål, E. Jerremalm, H. Ehrsson, E.S. Arnér, Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radical Biology and Medicine* 39 (2005) 696–703.
- [127] G.-Q. Chen, J. Zhu, X.-G. Shi, J.-H. Ni, H.-J. Zhong, In Vitro Studies on Cellular and Molecular Mechanisms of Arsenic Trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Induces NB4 Cell Apoptosis With Down-regulation of Bcl-2 Expression and Modulation of PML-RAR $\alpha$ /PML Proteins, *Blood* 88 (1996) 1052–1061.
- [128] R. Pearson, Hard and Soft Acids and Bases, *Journal of the American Chemical Society* 85 (1963) 3533–3539.
- [129] S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Lagasee, J.L. Whitworth, A. Jusko, C. Li, N.A. Wood, J. Willingham, Reduction and Anticancer Activity of Platinum(IV) Complexes, *Inorganic Chemistry* 37 (1998) 2500–2504.
- [130] J.E. Biaglow, R.E. Miller, The Thioredoxin Reductase/Thioredoxin System, *Cancer Biology & Therapy* 4 (2005) 6–13.
- [131] R. Franco, J.A. Cidlowski, Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death and Differentiation* 16 (2009) 1303–1314.
- [132] J. Schredelseker, G. Krumschnabel, Der Zebrafisch als vielseitiges Modellsystem. Vom Zierfisch zum Forschungsobjekt, *Biologie in unserer Zeit* 39 (2009) 389–397.
- [133] P. Chuenlei, L.S. Wen, S. Carlos, P. McGrath, Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening, *ASSAY and Drug Development Technologies* 1 (2002) 41–48.
- [134] S. Berghmans, P. Butler, P. Goldsmith, G. Waldron, I. Gardner, Z. Golder, F.M. Richards, G. Kimber, A. Roach, W. Alderton, A. Fleming, Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function — potential safety screens for early drug discovery, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58 (2008) 59–68.

- [135] G.J. Lieschke, P.D. Currie, Animal models of human disease: zebrafish swim into view, *Nature Reviews Genetics* 8 (2007) 353–367.
- [136] P. McGrath, C.-Q. Li, Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity, *Drug Discovery Today* 13 (2008) 394–401.
- [137] A.L. Rubinstein, Zebrafish assays for drug toxicity screening, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2 (2006) 231–240.
- [138] C. Ma, C. Parng, W.L. Seng, C. Zhang, C. Willett, P. McGrath, Zebrafish - an in vivo model for drug screening, *Innovations in Pharmaceutical Technology* 3 (2003) 38, 40, 42, 44-45.
- [139] M. Westerfield, *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4. Aufl., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000.
- [140] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists* 203 (1995) 253–310.
- [141] U. Langheinrich, Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk, *BioEssays* 25 (2003) 904–912.
- [142] D.Y. Stainier, M.C. Fishman, The zebrafish as a model system to study cardiovascular development, *Trends in Cardiovascular Medicine* 4 (1994) 207–212.
- [143] P. McGrath, *Zebrafish: Methods for assessing drug safety and toxicity*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J, 2011.
- [144] M. Granato, C. Nüsslein-Volhard, Fishing for genes controlling development, *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (1996) 461–468.
- [145] K. Dooley, Zebrafish: a model system for the study of human disease, *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (2000) 252–256.
- [146] P. Haffter, M. Granato, M. Brand, M. Mullins, M. Hammerschmidt, The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*, *Development (Cambridge, United Kingdom)* 123 (1996) 1–36.
- [147] W. Talbot, N. Hopkins, Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome, *Genes & Development* (2000) 755–762.



- [148] J.M. Spitsbergen, M.L. Kent, The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research-advantages and current limitations, *Toxicologic Pathology* (2003) 62–87.
- [149] C. Parng, In vivo zebrafish assays for toxicity testing, *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 8 (2005) 100–106.
- [150] N. Lewen, The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011) 653–661.
- [151] J. Schur, I. Ott, Neuerungen in der Spurenelementanalytik, *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2013) 154–155.
- [152] A. Beer, Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten., *Annalen der Physik und Chemie* (1852) 78–88.
- [153] P. Bouguer, *Essai d'optique, Sur la gradation de la lumière.*, Claude Jombert, Paris, 1729.
- [154] J. Lambert, *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae.*, Sumptibus Vidae Eberhardi Klett, 1760.
- [155] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, 4. durchges. u. aktualis. Aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2008.
- [156] M. Resano, E. García-Ruiz, High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 323–330.
- [157] B. Welz, *High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [158] B. Welz, High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (2005) 69–71.
- [159] B. Welz, M. Sperling, *Atomabsorptionsspektrometrie*, 4. neubearb. Aufl, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.

- [160] M. Shavit, D. Peri, C.M. Manna, J.S. Alexander, E.Y. Tshuva, Active Cytotoxic Reagents Based on Non-metallocene Non-diketonato Well-Defined C2 - Symmetrical Titanium Complexes of Tetradentate Bis(phenolato) Ligands, *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007) 12098–12099.
- [161] J. Balsells, P.J. Carroll, P.J. Walsh, Achiral Tetrahydrosalen Ligands for the Synthesis of C2 -Symmetric Titanium Complexes: A Structure and Diastereoselectivity Study, *Inorganic Chemistry* 40 (2001) 5568–5574.
- [162] A.J. Chmura, M.G. Davidson, M.D. Jones, M.D. Lunn, M.F. Mahon, A.F. Johnson, P. Khunkamchoo, S.L. Roberts, S.S.F. Wong, Group 4 Complexes with Aminebisphenolate Ligands and Their Application for the Ring Opening Polymerization of Cyclic Esters, *Macromolecules* 39 (2006) 7250–7257.
- [163] S. Gendler, S. Segal, I. Goldberg, Z. Goldschmidt, M. Kol, Titanium and Zirconium Complexes of Dianionic and Trianionic Amine–Phenolate-Type Ligands in Catalysis of Lactide Polymerization, *Inorganic Chemistry* 45 (2006) 4783–4790.
- [164] E.Y. Tshuva, I. Goldberg, M. Kol, Z. Goldschmidt, Coordination Chemistry of Amine Bis(phenolate) Titanium Complexes: Tuning Complex Type and Structure by Ligand Modification, *Inorganic Chemistry* 40 (2001) 4263–4270.
- [165] C.M. Manna, M. Shavit, E.Y. Tshuva, Structural characterization of dinuclear Ti(IV) complexes of rigid tetradentate dianionic diamine bis(phenolato) ligands; effect of steric bulk on coordination features, *Journal of Organometallic Chemistry* 693 (2008) 3947–3950.
- [166] J. Gao, Y.G. Liu, R. Liu, R.A. Zingaro, Herceptin–Platinum(II) Binding Complexes: Novel Cancer-Cell-Specific Agents, *ChemMedChem* 3 (2008) 954–962.
- [167] A. Yeori, S. Groysman, I. Goldberg, M. Kol, Diastereoisomerically Selective Enantiomerically Pure Titanium Complexes of Salan Ligands: Synthesis, Structure, and Preliminary Activity Studies, *Inorganic Chemistry* 44 (2005) 4466–4468.
- [168] C.M. Manna, O. Braitbard, E. Weiss, J. Hochman, E.Y. Tshuva, Cytotoxic Salan-Titanium(IV) Complexes: High Activity Toward a Range of Sensitive and Drug-Resistant Cell Lines, and Mechanistic Insights, *ChemMedChem* 7 (2012) 703–708.

- [169] C.M. Manna, E.Y. Tshuva, Markedly different cytotoxicity of the two enantiomers of C<sub>2</sub>-symmetrical Ti(IV) phenolato complexes; mechanistic implications, *Dalton Transactions* 39 (2010) 1182–1184.
- [170] D. Peri, S. Meker, M. Shavit, E.Y. Tshuva, Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, and Hydrolytic Behavior of C<sub>2</sub>- and C<sub>1</sub>-Symmetrical Ti<sup>IV</sup> Complexes of Tetradentate Diamine Bis(Phenolato) Ligands: A New Class of Antitumor Agents, *Chemistry - A European Journal* 15 (2009) 2403–2415.
- [171] D. Peri, S. Meker, C.M. Manna, E.Y. Tshuva, Different ortho and para Electronic Effects on Hydrolysis and Cytotoxicity of Diamino Bis(Phenolato) “Salan” Ti(IV) Complexes, *Inorganic Chemistry* 50 (2011) 1030–1038.
- [172] G. Gasser, *Inorganic chemical biology: Principles, techniques and applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2014.
- [173] A. Timerbaev, S. Sturup, Analytical approaches for assaying metallodrugs in biological samples: recent methodological developments and future trends, *Current Drug Metabolism* 13 (2012) 272–283.
- [174] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Huang, M. Okrus, B. Radziuk, Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61 (2006) 1015–1030.
- [175] B. Welz, D.L. Borges, F.G. Lepri, M.G.R. Vale, U. Heitmann, High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 873–883.
- [176] N. Szoboszlai, Z. Polgári, V.G. Mihucz, G. Záray, Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications, *Analytica Chimica Acta* 633 (2009) 1–18.
- [177] M. West, A.T. Ellis, P.J. Potts, C. Strel, C. Vanhoof, D. Wegrzynek, P. Wobrauschek, 2013 Atomic spectrometry update—A review of advances in X-ray fluorescence spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 1544.

- [178] E.E. Brouwers, M. Tibben, H. Rosing, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical pharmacological oncology research, *Mass Spectrometry Reviews* 27 (2008) 67–100.
- [179] T.J. Einhauser, T.G. Pieper, B.K. Keppler, Titanium determination in human blood plasma by ICP-OES, longitudinally, and transversally heated Zeeman ETAAS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1173–1176.
- [180] W. Slavin, D. Manning, G. Carnrick, Effect of Graphite Furnace Substrate Materials on Analyses by Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Analytical Chemistry* 53 (1981) 1504–1509.
- [181] A. Aller, Roll-over effect in graphite furnace atomic absorption spectrometry with a gold pulsed hollow-cathode lamp, *Analytica Chimica Acta* 284 (1993) 361–366.
- [182] L. de Galan, M. de Loos-Vollebregt, Roll-over of analytical curves in atomic absorption spectrometry arising from background correction with pulsed hollow-cathode lamps, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 39 (1984) 1011–1019.
- [183] I. Ott, M. Scharwitz, H. Scheffler, W.S. Sheldrick, R. Gust, Atomic absorption spectrometric determination of the iridium content in tumor cells exposed to an iridium metallodrug, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 (2008) 938–942.
- [184] I. Ott, H. Scheffler, R. Gust, Development of a Method for the Quantification of the Molar Gold Concentration in Tumour Cells Exposed to Gold-Containing Drugs, *ChemMedChem* 2 (2007) 702–707.
- [185] R. Hoehn, F. Umland, Untersuchungen zum Matrixeffekt bei der Atomabsorption am Beispiel Eisen, Kobalt, Nickel, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 258 (1972) 100–106.
- [186] E. Iwamoto, M. Itamoto, K. Nishioka, S. Imai, Y. Hayashi, T. Kumamaru, Effects of Conditions for Pyrolysis of Ascorbic Acid as a Chemical Modifier on the Vaporization Mechanism of Gold in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 1293–1296.

- [187] M.A. Kabil, M.A. Mostafa, A.M. Shallaby, T.I. Zaid, Analytical Application of some Chemical Modifiers in Atomic Absorption Spectrometric Investigation and Determination of Mn(II) and Mn(VII), *Analytical Letters* 31 (1998) 1563–1591.
- [188] Eudralex, Volume 4. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines., 2014, [http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm), accessed 15 Februar 2014.
- [189] Eudralex, Annex 15. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use, 2014, [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/pdfs-en/v4an15\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/pdfs-en/v4an15_en.pdf), accessed 15 Februar 2014.
- [190] European Medicines Agency, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95), 1995, <http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/038195EN.PDF>, accessed 14 Januar 2014.
- [191] W. Schmiegel, C. Pox, A. Reinacher-Schick, G. Adler, W. Fleig, U.R. Fçlsch, P. Frhmorgen, U. Graeven, S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“: Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (fr die Themenkomplexe IV, VI und VII), *Zeitschrift für Gastroenterologie* 46 (2008) 1–73.
- [192] Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2012, [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OL\\_k\\_S3\\_\\_Brustkrebs\\_Mammakarzinom\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Nachsorge\\_2012-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_k_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf), accessed 5 Februar 2014.
- [193] S. Meker, K. Margulis-Goshen, E. Weiss, S. Magdassi, E.Y. Tshuva, High Antitumor Activity of Highly Resistant Salan-Titanium(IV) Complexes in Nanoparticles: An Identified Active Species, *Angewandte Chemie International Edition* 51 (2012) 10515–10517.
- [194] A.W. Hayes, Principles and methods of toxicology, 4. Aufl., Taylor & Francis, Philadelphia, PA, 2001.
- [195] T.A. Immel, U. Groth, T. Huhn, P. Öhlschläger, V. Saks, Titanium Salan Complexes Displays Strong Antitumor Properties In Vitro and In Vivo in Mice, *PLOS ONE* 6 (2011) 1–7.

- [196] T.A. Immel, M. Grützke, A.-K. Späte, U. Groth, P. Öhlschläger, T. Huhn, Synthesis and X-ray structure analysis of a heptacoordinate titanium(IV)-bis-chelate with enhanced in vivo antitumor efficacy, *Chemical Communications* 48 (2012) 5790.
- [197] J. Ma, G. Stoter, J. Verweij, Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38 (1996) 391–394.
- [198] G. Natarajan, R. Malathi, E. Holler, Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited, *Biochemical Pharmacology* 58 (1999) 1625–1629.
- [199] P. Koepf-Maier, H. Koepf, Tumor Inhibition by Titanocene Dichloride: First Clues to the Mechanism of Action, *Naturwissenschaften* 67 (1980) 415–416.
- [200] P. Koepf-Maier, W. Wagner, H. Koepf, Different Inhibition Pattern of the Nucleic Acid Metabolism after in Vitro Treatment with Titanocene and Vanadocene Dichlorides 68 (1981) 272–273.
- [201] F. Kratz, Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release* 132 (2008) 171–183.
- [202] A.D. Tinoco, E.V. Eames, C.D. Incarvito, A.M. Valentine, Hydrolytic Metal with a Hydrophobic Periphery: Titanium(IV) Complexes of Naphthalene-2,3-diolate and Interactions with Serum Albumin, *Inorganic Chemistry* 47 (2008) 8380–8390.
- [203] L.M. Gao, R. Hernández, J. Matta, E. Meléndez, Synthesis, Ti(IV) intake by apotransferrin and cytotoxic properties of functionalized titanocene dichlorides, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12 (2007) 959–967.
- [204] M. Guo, H. Sun, H.J. McArdle, L. Gambling, P.J. Sadler, Ti IV Uptake and Release by Human Serum Transferrin and Recognition of Ti IV -Transferrin by Cancer Cells: Understanding the Mechanism of Action of the Anticancer Drug Titanocene Dichloride †, *Biochemistry* 39 (2000) 10023–10033.
- [205] M. Hogan, J. Claffey, C. Pampillón, R. Watson, G. William, M. Tacke, Synthesis and Cytotoxicity Studies of New Dimethylamino-Functionalized and Azole-Substituted Titanocene Anticancer Drugs, *Organometallics* 26 (2007) 2501–2506.

- [206] P. Koepf-Maier, W. Wagner, H. Koepf, In vitro cell growth inhibition by metallocene dichlorides, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 5 (1981) 237–241.
- [207] M.L. McLaughlin, J. Cronan Jr, T.R. Schaller, R.D. Snelling, DNA-Metal Binding by Antitumor-Active Metallocene Dichlorides from Inductively Coupled Plasma Spectroscopy Analysis: Titanocene Dichloride Forms DNA-Cp<sub>2</sub>Ti or DNA-CpTi Adducts Depending on pH, *Journal of the American Chemical Society* 112 (1990) 8949–8952.
- [208] L.P. Rivory, S.M. Pond, D.J. Winzor, The influence of pH on the interaction of lipophilic anthracyclines with bovine serum albumin, *Biochemical Pharmacology* 44 (1992) 2347–2355.
- [209] R. Artali, G. Bombieri, L. Calabi, A. Del Pra, A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites, *Il Farmaco* 60 (2005) 485–495.
- [210] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin, *Journal of Molecular Biology* 353 (2005) 38–52.
- [211] F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Dreves, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, C. Unger, Probing the Cysteine-34 Position of Endogenous Serum Albumin with Thiol-Binding Doxorubicin Derivatives. Improved Efficacy of an Acid-Sensitive Doxorubicin Derivative with Specific Albumin-Binding Properties Compared to That of the Parent Compound, *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2002) 5523–5533.
- [212] R. Rubbiani, Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes: a Chemical and Biological Study of their Therapeutic Potential as New Anticancer Agents, Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig, 2013.
- [213] G. Lally, A. Deally, F. Hackenberg, S. Quinn, M. Tacke, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* submitted.
- [214] P.M. Abeysinghe, M.M. Harding, Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives, *Dalton Transactions* (2007) 3474–3482.

- [215] M. Erickson, F. Fronczek, M. McLaughlin, The syn tetramethylethano-bridged 3,3'-di-tert-butyltitanocene dichloride, *Acta Crystallographica C* 46 (1990) 1802–1804.
- [216] J.L. Vera, F.R. Román, E. Meléndez, Study of titanocene-DNA and molybdenocene-DNA interactions by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (2004) 399–403.
- [217] A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 (2004) 73–78.
- [218] D.P. Gately, S.B. Howell, Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review, *British Journal of Cancer* 67 (1993) 1171–1176.
- [219] S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 14298–14302.
- [220] A.K. Holzer, S.B. Howell, The Internalization and Degradation of Human Copper Transporter 1 following Cisplatin Exposure, *Cancer Research* 66 (2006) 10944–10952.
- [221] R. Hernández, J. Méndez, J. Lamboy, M. Torres, F.R. Román, E. Meléndez, Titanium(IV) complexes: Cytotoxicity and cellular uptake of titanium(IV) complexes on caco-2 cell line, *Toxicology in Vitro* 24 (2010) 178–183.
- [222] P. Koepf-Maier, S. Gerlach, Pattern of toxicity by titanocene dichloride in mice, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 111 (1986) 243–247.
- [223] C. Mereschowsky, Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis: einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen, *Biologisches Centralblatt* 30 (1910) 353–367.
- [224] J.L. Hickey, R.A. Ruhayel, P.J. Barnard, M.V. Baker, S.J. Berners-Price, A. Filipovska, Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols, *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 12570–12571.



- [225] M. Muramatsu, Y. Hayashi, T. Onishi, M. Sakai, K. Takai, T. Kashiya, Rapid isolation of nucleoli from detergent purified nuclei of various tumor and tissue culture cells, *Experimental Cell Research* 88 (1974) 345–351.
- [226] A. Lüning, J. Schur, L. Hamel, I. Ott, A. Klein, Strong Cytotoxicity of Organometallic Platinum Complexes with Alkynyl Ligands, *Organometallics* 32 (2013) 3662–3672.
- [227] H. Clark, L. Manzer, Reactions of ( $\pi$ -1,5-cyclooctadiene) organoplatinum(II) compounds and the synthesis of perfluoroalkylplatinum complexes, *Journal of Organometallic Chemistry* 59 (1973) 411–428.
- [228] G. Serbedzija, E. Flynn, C. Willett, Zebrafish angiogenesis: A new model for drug screening, *Angiogenesis* 3 (1999) 353–359.
- [229] J.-M. Malinge, M.-J. Giraud-Panis, M. Leng, Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA, *Journal of Inorganic Biochemistry* 77 (1999) 23–29.
- [230] J. Holford, P. Beale, F. Boxall, S. Sharp, L. Kelland, Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 36 (2000) 1984–1990.
- [231] S.W. Johnson, D.-W. Shen, Pastan. I., M.M. Gottesman, T.C. Hamilton, Cross-Resistance, Cisplatin Accumulation, and Platinum-DNA Adduct Formation and Removal in Cisplatin-Sensitive and -Resistant Human Hepatoma Cell Lines, *Experimental Cell Research* 226 (1996) 133–139.
- [232] M. Mishima, G. Samimi, A. Kondo, X. Lin, S. Howell, The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 38 (2002) 1405–1412.
- [233] R.P. Perez, T.C. Hamilton, R.F. Ozols, Resistance to alkylating agents and cisplatin: Insights from ovarian carcinoma model systems, *Pharmacology & Therapeutics* 48 (1990) 19–27.
- [234] R. Perez, Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 34 (1998) 1535–1542.
- [235] G. Chu, Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair, *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 787–790.

- [236] L. Martelli, F. Di Mario, E. Ragazzi, P. Apostoli, R. Leone, P. Perego, G. Fumagalli, Different accumulation of cisplatin, oxaliplatin and JM216 in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumour cells, *Biochemical Pharmacology* 72 (2006) 693–700.
- [237] J.A. Platts, D.E. Hibbs, T.W. Hambley, M.D. Hall, Calculation of the Hydrophobicity of Platinum Drugs, *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2001) 472–474.
- [238] F.H. Shirazi, J.M. Molepo, D.J. Stewart, C.E. Ng, G.P. Raaphorst, R. Goel, Cytotoxicity, Accumulation, and Efflux of Cisplatin and Its Metabolites in Human Ovarian Carcinoma Cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 140 (1996) 211–218.
- [239] T. Minami, M. Ichii, Y. Okazaki, Comparison of three different methods for measurement of tissue platinum level, *Biological Trace Element Research* 48 (1995).
- [240] T.J. Einhauser, M. Galanski, B.K. Keppler, Determination of Platinum in Protein-bound CDDP and DBP by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 747–750.
- [241] P. Andrews, S. Velury, S. Mann, S. Howell, m-Diamminedichloroplatinum(II) Accumulation in Sensitive and Resistant Human Ovarian Carcinoma Cells, *Cancer Research* 48 (1988) 68–73.
- [242] H. Reile, G. Bernhardt, M. Koch, H. Schonenberger, M. Hollstein, F. Lux, Chemosensitivity of human MCF-7 breast cancer cells to diastereoisomeric diqua(1,2-diphenylethylenediamine) platinum(II) sulfates and specific platinum accumulation, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 30 (1992) 113–122.
- [243] T. Kapp, A. Dullin, R. Gust, Platinum(II)–Dendrimer Conjugates: Synthesis and Investigations on Cytotoxicity, Cellular Distribution, Platinum Release, DNA, and Protein Binding, *Bioconjugate Chemistry* 21 (2010) 328–337.
- [244] P.M. Takahara, A.C. Rosenzweig, C.A. Frederick, S.J. Lippard, Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin, *Nature* 377 (1995) 649–652.

- [245] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, Glutathione-associated *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) Metabolism and ATP-dependent Efflux of Leukemia Cells, *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 20116–20125.
- [246] C.J. Adams, S.L. James, X. Liu, P.R. Raithby, L.J. Yellowlees, Synthesis and characterization of new platinum-acetylide complexes containing diimine ligands, *Dalton Transactions* 1 (2000) 63–67.
- [247] V. Gandin, A.P. Fernandes, M.P. Rigobello, B. Dani, F. Sorrentino, F. Tisato, M. Björnstedt, A. Bindoli, A. Sturaro, R. Rella, C. Marzano, Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase, *Biochemical Pharmacology* 79 (2010) 90–101.
- [248] I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H.W. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.P. Bagowski, A Gold(I) Phosphine Complex Containing a Naphthalimide Ligand Functions as a TrxR Inhibiting Antiproliferative Agent and Angiogenesis Inhibitor, *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (2009) 763–770.
- [249] N.J. Sweeney, O. Mendoza, H. Müller-Bunz, C. Pampillón, F.-J.K. Rehmann, K. Strohfeldt, M. Tacke, Novel benzyl substituted titanocene anti-cancer drugs, *Journal of Organometallic Chemistry* 690 (2005) 4537–4544.
- [250] H. Scheffler, Y. You, I. Ott, Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes, *Polyhedron* 29 (2010) 66–69.
- [251] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254.
- [252] A.D. Smith, V.C. Morris, O.A. Levander, Rapid Determination of Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase Activities Using a 96-well Microplate Format: Comparison to Standard Cuvette-based Assays, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 71 (2001) 87–92.